

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО» МОН УКРАЇНИ

ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА»

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО» МОН УКРАЇНИ

*Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису*

**Луценко Тетяна Миколаївна**

УДК 573.6.083.3+573.6.086.8

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

# **БІОТЕХНОЛОГІЯ ПРЕПАРАТІВ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ ТА ЇХ СТАНДАРТИЗАЦІЯ**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело:

\_\_\_\_\_ Т.М. Луценко

**Науковий керівник:** Галкін Олександр Юрійович, д.б.н., доц.

Київ – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Луценко Т. М.* Біотехнологія препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та їх стандартизація. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України. – ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА». – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України. Київ, 2018.

На сучасному етапі розвитку суспільства біологія дає початок технологіям, що можуть докорінно змінити життя людства. Взаємодія молекулярної біології, генетики, генної інженерії, біохімії та мікробіології створила передумови для розвитку нової галузі біології – генної біоінженерії.

Інтерлейкін-7 (ІЛ-7) був вперше виділений майже 30 років тому. Проте повний набір фізіологічних функцій цього цитокіну, особливо тих, які залучені в регуляції гомеостазу лімфоцитів був тільки недавно відкритий. ІЛ-7 – це центральний цитокін імунної системи, який грає важливу роль у модуляції Т- і В-клітинного розвитку і Т-клітинного гомеостазу. Потенціал і широкий спектр ефектів дозволяє припустити, що оперування ІЛ-7 дозволить стимулювати імунітет у пацієнтів з лімфоцитарним виснаженням, аутоімунними захворюваннями тощо. З точки зору терапевтичного потенціалу існує значна зацікавленість у розвитку технологій для виробництва біологічно активного поліпептиду ІЛ-7. Посилаючись на сучасні досягнення молекулярної біології, генетики та біотехнології оптимальним рішенням при розробці технології отримання людського ІЛ-7, є створення рекомбінантного продуцента для синтезу описаного цитокіну. Переваги отримання та використання рекомбінантного протеїну полягають в можливості синтезу значно більших кількостей цільового білка, достатніх для виробництва готових лікарських

форм, його вірусній безпечності та отриманні білка з поліпшеними властивостями.

Враховуючи високий терапевтичний потенціал даного цитокіну важливим напрямом подальших розробок є створення різноманітних фармацевтичних форм на основі рекомбінатного ІЛ-7 людини (pІЛ-7), що забезпечуватимуть доставку pІЛ-7 та збереження його стабільності та біологічної активності. Характеристика отриманих за допомогою рекомбінантних технологій білків повинна включати визначення їх фізико-хімічних властивостей, біологічної активності, імунохімічних властивостей, чистоти та наявності домішок за допомогою відповідних сучасних методів, та є необхідною умовою для розробки повних і відповідних специфікацій. Валідація аналітичних методик являє собою процедуру експериментального доведення того, що методика придатна для розв'язання поставлених завдань. Оцінка придатності аналітичних методик є одним із найважливіших елементів системи забезпечення якості продукції фармацевтичної та біотехнологічної галузей. Таким чином, розробка біотехнологій створення препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та їх біоаналітична стандартизація є вкрай актуальними та пріоритетними завданнями сучасної промислової та аналітичної біотехнології.

Метою роботи було наукове обґрунтування та розроблення біотехнології субстанції pІЛ-7 людини та та назальної форми препарату pІЛ-7 людини, а також параметрів їх технологічної та аналітичної стандартизації.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні задачі.

1. Розробити технологію одержання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, придатної для виготовлення з неї нестерильних препаратів.

2. Розробити технологію одержання готового препарату назального застосування на основі субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

3. Дослідити біологічну активність рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях *in vitro* як основу для біологічної стандартизації препаратів на його основі.

4. Обґрунтувати параметри аналітичної стандартизації різних препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, розробити методи контролю їх якості та провести їх валідацію.

5. Провести дослідження стабільності різних препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

6. Провести перспективну валідацію технології виготовлення готового препарату рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на основі оцінки ризиків виробничого процесу.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено оптимізовану технологію біосинтезу, виділення та очистки рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із високою біологічною активністю *in vitro*.

Вперше показано наявність безпосередньої протівірусної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини по відношенню до вірусу гепатиту С в умовах *in vitro* та доведено можливість використання відповідної методики для стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Вперше науково обґрунтовано технологію отримання назальної форми препарату на основі отриманого рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, а також принципи його аналітичної стандартизації із застосуванням фізико-хімічних, мікробіологічних та імунологічних методів.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення препаратів рекомбінантних білків терапевтичного призначення.

Практичне значення отриманих результатів. Проведено адаптацію та валідацію методики визначення біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із використанням моноклеарних клітин периферичної крові людини, що дозволило використовувати запропонований метод для рутинного аналітичного контролю якості препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Проведено перспективну валідацію технології отримання назального спрею на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок, яка підтвердила стабільність процесу та його відповідність критеріям прийнятності (акт апробації від ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» від 03.07.2017 р.).

Для назальної форми рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини розроблено технічні умови ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний», на які отримано позитивний висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи від Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (№ 602-123-20-2/15716 від 19.05.2017 р.).

Науково-методичні рекомендації щодо аналізу ризиків технології назальних спреїв на основі рекомбінантних білків використовуються у ДП «Український медичний центр сертифікації» МОЗ України (м. Київ) при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентуються постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів».

Результати роботи впроваджено у викладання курсів «Медична біотехнологія» та «Розробка біофармацевтичної продукції та організація виробництва» на кафедрі промислової біотехнології КПІ імені Ігоря Сікорського.

Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилися спільно із науковим керівником.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 14 праць, серед яких: 1 монографія, 7 наукових фахових статей (у т.ч. 2 статті у виданнях іноземних країн, 3 статті у вітчизняних журналах, які представлено у міжнародних наукометричних базах даних), 2 статті у інших наукових виданнях, 4 тези доповідей.

*Ключові слова:* рекомбінантний інтерлейкін-7 людини, технологія, стандартизація, біологічна активність, валідація.

## SUMMARY

Lutsenko T.M. Biotechnology of preparations of recombinant human interleukin-7 and its standardization. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for the degree of a candidate of technical sciences in the specialty 03.00.20 – biotechnology. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute” (Ministry of Education and Science of Ukraine). – UA “PRO-PHARMA”, LLC. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute” (Ministry of Education and Science of Ukraine). Kyiv, 2018.

At the present stage of society’s development, biology gives rise to technologies that can radically change the life of mankind. The interaction of molecular biology, genetics, genetic engineering, biochemistry and microbiology has created the prerequisites for the development of a new branch of biology – gene bioengineering.

Interleukin-7 (IL-7) was first isolated nearly 30 years ago. However, a complete set of physiological functions of this cytokine, especially those involved in the regulation of homeostasis of lymphocytes, was only recently discovered. IL-7 is a central cytokine of the immune system, which plays an important role in the modulation of T- and B-cell development and T-cell homeostasis. Potentials and a wide range of effects suggest that IL-7 operation will stimulate immunity in patients with lymphocytic exhaustion, autoimmune diseases, etc. In terms of therapeutic potential, there is a strong interest in the development of technologies for the production of a biologically active polypeptide IL-7. Referring to modern advances in molecular biology, genetics and biotechnology, the optimal solution in developing the technology of human IL-7 production is to create a recombinant producer for the synthesis of the described cytokine. The benefits of receiving and using a recombinant protein are the ability to synthesize significantly larger amounts of target protein, sufficient for the production of the finished dosage forms, its viral safety, and obtaining protein with improved properties.

Taking into account the high therapeutic potential of this cytokine, an important direction for further development is the creation of various pharmaceutical forms based on recombinant human IL-7 (rIL-7), which will ensure the delivery of rIL-7 and the preservation of its stability and biological activity. Characteristics of recombinant protein syntheses should include the determination of their physical and chemical properties, biological activity, immunochemical properties, purity and presence of impurities using appropriate modern methods, and is a prerequisite for the development of complete and relevant specifications. Validation of analytical techniques is a procedure of experimental proof that the method is suitable for solving the tasks. The assessment of the suitability of analytical techniques is one of the most important elements of the quality assurance system for pharmaceuticals and biotechnology. Thus, the development of biotechnologies for the preparation of drugs based on recombinant human interleukin-7 and its bioanalytical standardization are extremely topical and priority tasks of modern industrial and analytical biotechnology.

The purpose of the work was to provide scientific substantiation and development of biotechnology of substance of rIL-7 and nasal preparation of rIL-7, as well as parameters of its technological and analytical standardization.

To achieve the goal, the following tasks were set.

1. To develop a technology for the production of a substance of recombinant human interleukin-7, suitable for the manufacture of non-sterile drugs from it.
2. To develop the technology of obtaining the finished preparation of nasal application on the basis of the substance of the recombinant human interleukin-7.
3. To investigate the biological activity of recombinant human interleukin-7 on various *in vitro* models as a basis for biological standardization of drugs.
4. To substantiate the parameters of analytical standardization of various preparations of recombinant human interleukin-7, to develop methods to control its quality and to validate it.
5. Conduct a study of the stability of various drugs of recombinant human interleukin-7.



6. To carry out the perspective validation of the technology of manufacturing the finished preparation of recombinant human interleukin-7 on the basis of risk assessment of the manufacturing process.

Scientific novelty of the obtained results. An optimized biosynthesis technology, isolation and purification of recombinant human interleukin-7 with high biological activity *in vitro* was developed.

For the first time, the presence of direct antiviral activity of recombinant human interleukin-7 in relation to the hepatitis C virus *in vitro* and the possibility of using an appropriate method for standardizing drugs based on recombinant human interleukin-7 was demonstrated.

For the first time, the technology of obtaining the nasal form of the drug on the basis of the received recombinant human interleukin-7, as well as the principles of its analytical standardization with the use of physico-chemical, microbiological and immunological methods, is scientifically substantiated.

The results of the work were supplemented with modern scientific and methodical approaches for the preparation of preparations of recombinant proteins for therapeutic purposes.

The practical value of the results. The adaptation and validation of the method of determining the biological activity of recombinant human interleukin-7 with the use of mononuclear cells of human peripheral blood has been carried out, which allowed using the proposed method for routine analytical quality control of drugs based on recombinant human interleukin-7.

Perspective validation of the technology for the preparation of nasal spray on the basis of recombinant human interleukin-7 with the use of the system of risk analysis and critical control points has been proven, which confirmed the stability of the process and its compliance with the eligibility criteria (act of approbation from UA “PRO-PHARMA” dated July 03, 2017).

For the nasal form of recombinant interleukin-7, technical specifications TU U 20.4-34414427-013:2017 “Prophylactic and hygienic product” have been developed, for which the positive conclusion of the state sanitary-and-

epidemiological examination from the State Service of Ukraine for Food Safety and Consumer Protection was received (No. 602-123-20-2/15716 dated May 19, 2017).

The scientific and methodological recommendations for the analysis of the risks of nasal spray technology on the basis of recombinant proteins are used by the State Medical Enterprise of the Ukrainian Medical Certification Center of the Ministry of Health of Ukraine (Kyiv) in assessing the conformity of medical products regulated by the Decree of the Cabinet of Ministers of Ukraine dated October 2, 2013 No. 753 “On Approval of the Technical Regulations Regarding Medical Products”.

The results of the work were introduced in teaching medical biotechnology courses “Medical biotechnology” and “Development of biopharmaceutical products and production organization” (Industrial Biotechnology Department of Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute).

The results of the work presented in the thesis, obtained by the author or with her direct participation. The planning of experimental work was conducted jointly with the scientific supervisor.

On the theme of the dissertation, 14 works were published, among them: 1 monograph, 7 scientific articles (including 2 articles in foreign journals, 3 articles in domestic journals, presented in international science-computer databases), 2 articles in others scientific editions, 4 theses of reports.

*Keywords:* recombinant human interleukin-7, technology, standardization, biological activity, validation.

## Список публікацій здобувача.

### Монографія

1. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Отримання рекомбінантних білків та їх використання у серодіагностиці / Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Широбоков, А.А. Григоренко, О.М. Дуган, Т.М. Луценко, А.Г. Комар; Під ред. В.П. Широбокова. – К.: НТУУ «КПІ», 2015. – С. 112-145.

### Статті у фахових наукових виданнях України та інших країн

2. Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Карпенко О.Я., Дуган О.М. Обґрунтування параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2015. – Вип. 812. – С. 175–183.

3. Порва Ю.І., Рибалко С.Л., Дядюн С.Т., Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Похолоденко Я.О., Горбатюк О.Б. Дослідження противірусної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2015. – №3. – С. 52–60.

4. Луценко Т.Н., Галкин А.Ю. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химия, технология органических веществ и биотехнология». – 2015. – № 4 (177). – С. 188–197. (Білорусь).

5. Луценко Т.М., Андрюкова Л.М., Фетісова Н.Г., Марінцова Н.Г., Галкін О.Ю. Обґрунтування складу та технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2016. – Вип. 841. – С. 174–180.

6. Луценко Т.М., Старосила Д.Б., Рибалко С.Л., Галкін О.Ю. Методи

оцінки біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та дослідження стабільності препарату на його основі // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2016. – №3. – С. 48–54.

7. Луценко Т.М., Горшунов Ю.В., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2017. – №3. – С. 56–63.

8. Motronenko V.V., Lutsenko T.M., Ruzhynska L.I., Gorshunov Yu.V., Galkin O.Yu. Comparative analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химические технологии, биотехнологии, геоэкология». – 2017. – № 2 (199). – С. 241–246. (Білорусь).

#### Статті у інших наукових виданнях

9. Galkin O.Yu., Lutsenko T.M., Gorshunov Yu.V., Motronenko V.V. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, 3. – P. 52–59.

10. Lutsenko T.M., Kovalenko M.V., Galkin O.Yu. Validation of biological activity testing procedure of recombinant human interleukin-7 // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, 1. – P. 82–89.

#### Тези доповідей

11. Lutsenko T.N., Galkin A.Yu. Biotechnological approaches of producing recombinant interleukin-7 human // Тези доповідей міжнародної наукової конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи в ХХІ столітті» (14-15 квітня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 47-48.

12. Луценко Т.М. Біологічна стандартизація препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Тези Х Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття», присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 53.

13. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Питання стандартизації субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Збірник тез V Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (12-13 травня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 47-48.

14. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Основні аспекти біологічної стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Тези VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2016. Молодіжний форум з нанобіотехнологій-2016» (25-26 травня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 81.

## ЗМІСТ

СПОСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	17
ВСТУП .....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	27
1.1. Обґрунтування біотехнологічних підходів отримання інтерлейкіну-7 людини рекомбінантного .....	27
1.1.1. Будова та фізико-хімічні властивості ІЛ-7 людини .....	27
1.1.2. Обґрунтування біотехнологічних підходів до створення штаму- продуценту та отримання рІЛ-7 .....	29
1.2. Принципи стандартизації препаратів на основі рекомбінантних білків...	39
Висновки до розділу 1 .....	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	51
2.1. Матеріали .....	51
2.1.1. Культури клітин .....	51
2.1.2. Віруси .....	52
2.1.3. Середовища та реактиви .....	52
2.1.4. Обладнання .....	53
2.2. Основні методи досліджень .....	53
2.2.1. Технологія одержання субстанції рІЛ-7 (мікробіологічні та молекулярно-біологічні методи) .....	53
2.2.2. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на різних моделях <i>in vitro</i> (вірусологічні та імунологічні методи) .....	57
2.2.3. Валідація методики визначення біологічної активності рІЛ-7 (математичні методи) .....	61
2.2.4. Фармакопейні мікробіологічні методи .....	62
2.2.5. Методика оцінки ризиків у технології препарату .....	67
2.2.6. Математичні методи .....	67
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ .....	68
3.1. Оптимізація умов біосинтезу рекомбінантного білка .....	68

3.2. Розробка методів виділення та очистки рекомбінантного білка .....	75
Висновки до розділу 2 .....	79
<b>РОЗДІЛ 4. БІОЛОГІЧНА ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНА СТАНДАРТИЗАЦІЯ</b>	
<b>СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ .....</b>	<b>80</b>
4.1. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на різних моделях <i>in vitro</i> як основа для його біологічної стандартизації .....	80
4.1.1. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С .....	80
4.1.2. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на мононуклеарних клітин периферичної крові .....	89
4.2. Валідація методики визначення біологічної активності рІЛ-7 на основі МТТ-тесту .....	92
4.3. Обґрунтування параметрів аналітичної стандартизації субстанції рІЛ-7 та методів контролю якості .....	95
4.3.1. Специфікація якості .....	95
4.3.2. Методи контролю якості .....	98
Висновки до розділу 4 .....	105
<b>РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА СКЛАДУ, ТЕХНОЛОГІЇ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ ТА ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЯ .....</b>	<b>107</b>
5.1. Обґрунтування складу та технології назальної форми препарату на основі рІЛ-7 .....	110
5.1.1. Обґрунтування складу допоміжних речовин .....	112
5.1.2. Розроблення технологічного процесу .....	116
5.2. Дослідження стабільності назальної форми препарату на основі рІЛ-7 .....	129
5.2.1. Дослідження антивірусної активності препаратів рІЛ-7 проти сурогатного вірусу гепатиту С .....	129
5.2.2. Дослідження антивірусної активності препаратів рІЛ-7 проти вірусу грипу .....	130

5.2.3. Дослідження антигерпетичної активності препаратів рІЛ-7 в стабілізуючих розчинах .....	131
5.2.4. Дослідження стабільності препаратів рІЛ-7 при довготривалому зберіганні.....	132
5.3. Обґрунтування параметрів аналітичної стандартизації препарату на основі рІЛ-7 та методів контролю його якості .....	135
5.3.1. Специфікація якості .....	135
5.3.2. Розробка методу визначення мікробіологічної чистоти препарату на основі рІЛ-7.....	138
5.3.3. Методи контролю якості .....	145
5.4. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рІЛ-7 та її перспективна валідація.....	149
5.4.1. Обґрунтування підходів із оцінки ризиків у технології отримання препарату.....	150
5.4.2. Оцінка ризиків виробничого процесу отримання препарату та його перспективна валідація.....	151
Висновки до розділу 5 .....	155
ВИСНОВКИ.....	158
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	160
ДОДАТОК А. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ ТА АПРОБАЦІЇ.....	172
ДОДАТОК Б. НОРМАТИВНИЙ ДОКУМЕНТ НА ПРЕПАРАТ.....	178



## СПОСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CC <sub>50</sub>	– 50% цитотоксичної концентрації
ED <sub>50</sub>	– ефективна (напівефективна) доза
EID <sub>50</sub>	– інфекційна (напівінфекційна) доза для ембріонів
НАССР	– Hazard Analysis and Critical Control Points
ICH	– The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ID <sub>50</sub>	– інфекційна (напівінфекційна) доза
IMDM	– Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IS	– індекс селективності
MDBK	– лінія клітин бичачої нирки (bovine kidney cells)
MDCK	– культура клітин нирки собак (Madin-Darby canine kidney)
RPMI	– Roswell Park Memorial Institute medium
ТАМС	– загальне число аеробних мікроорганізмів (total aerobic microbial count)
ТУМС	– загальне число дріжджових і пліснявих грибів (total yeast/mold count)
а.з.	– амінокислотний залишок
АС	– апаратурна схема
АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
БАР	– біологічно-активна речовина
БХК	– біцинхонінічна кислота
ВБВД	– вірус бичачої вірусної діареї
ВГС	– вірус гепатиту С
ВЕРХ	– вискоєфективна рідинна хроматографія
ВПГ	– вірус простого герпесу
ГАО	– гемаглютинуюча одиниця
ГЛФ	– готова лікарська форма
ГПМЦ	– гідроксипропілметилцелюлоза
ДЕАЕ	– диетиламіноетил
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДСН	– додецилсульфат натрію
ДФУ	– Державна фармакопея України

ЕДТА	– етилендіамінтетраоцтова кислота
ЕТС	– ембріональна теляча сироватка
ЄФ	– Європейська фармакопея
ЖС	– живильне середовище
ІІ-7	– інтерлейкін-7 людини
ІПТГ	– ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозід
ІФА	– імуноферментний аналіз
кДНК	– комплементарна ДНК
ККТ	– критична контрольна точка
КУО	– колонієутворююча одиниця
ЛФ	– лікарська форма
ММ	– молекулярна маса
МНПК	– моноклеарні клітини периферичної крові
МО	– міжнародна одиниця
МТТ	– 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразол бромід
НГВЩ	– невринома Гассерова вузла щура
НР	– нейтралізуючий розчин
ОГ (OD)	– оптична густина
ПААГ	– поліакриламідний гель
ПАР	– поверхнево-активна речовина
ПВП	– полівінілпіролідон
ПЕГ	– поліетиленгліколь
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
pІІ-7	– рекомбінантний інтерлейкін-7 людини
СЗ	– стандартний зразок
СР	– стабілізуючий розчин
т.п.н.	– тисяча пар нуклеотидів
ТВ	– тільця-включення
ТС	– технологічна схема
ТЦД <sub>50</sub>	– титр за цитопатичною дією
ФБР	– фосфатний буферний розчин
ФГА	– фітогемаглютинін
ЦПД	– цитопатична дія

## ВСТУП

**Актуальність теми.** На сучасному етапі розвитку суспільства біологія дає початок технологіям, що можуть докорінно змінити життя людства. Взаємодія молекулярної біології, генетики, генної інженерії, біохімії та мікробіології створила передумови для розвитку нової галузі біології – генної біоінженерії.

Серед продуктів, створених на основі генно-інженерних біотехнологій, найбільшого поширення набули рекомбінантні білки фармацевтичного призначення – білки, які знаходять застосування при лікуванні різноманітних хвороб, виготовленні тест-систем і противірусних вакцин, проведенні наукових досліджень. Успіхи генетичної інженерії призвели до того, що понад 100 білків людини (біорегуляторів, коректорів гомеостазу, факторів вродженого і набутого імунітету) можуть зберігати свою видоспецифічність. У клінічній практиці широко використовуються отримані на основі генно-інженерних технологій білки інсулін, інтерферони, еритропоєтин, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор та інші. Щороку поповнюється кількість противірусних вакцин, створених на основі рекомбінантних білків. Вони напрацьовуються як лікарські засоби шляхом мікробіологічного синтезу. При цьому технологія рекомбінантної ДНК дозволяє їх удосконалювати: підвищувати фізіологічну активність, знижувати ймовірність побічних реакцій після введення і тощо [1].

Одержання вірусних вакцин, отримання гормонів людини з біологічних рідин людини не може забезпечити кількісних показників, прийнятних для потреб медицини або взагалі є неможливим. Основним при отриманні рекомбінантних білків є вирішення проблеми дефіциту сировини, оскільки з людських тканин в промисловому масштабі отримувати їх неможливо.

Використання генно-інженерних методів для продукування рекомбінантних вірусних антигенів, гормонів значно розширює можливості їхнього отримання порівняно з традиційними методами. Як продуценти

рекомбінантних білків людини частіше за інших в даний час використовуються: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* [2].

Інтерлейкін-7 (ІЛ-7) був вперше виділений майже 30 років тому [3]. Проте повний набір фізіологічних функцій цього цитокіну, особливо тих, які залучені в регуляції гомеостазу лімфоцитів був тільки недавно відкритий. ІЛ-7 – це центральний цитокін імунної системи, який грає важливу роль у модуляції Т- і В-клітинного розвитку і Т-клітинного гомеостазу [4]. Потенціал і широкий спектр ефектів дозволяє припустити, що оперування ІЛ-7 дозволить стимулювати імунітет у пацієнтів з лімфоцитарним виснаженням, аутоімунними захворюваннями тощо. На сьогоднішній день ведуться активні дослідження ІЛ-7, як засобу для відновлення імунної системи людей, які перенесли трансплантацію кісткового мозку, високоактивну антиретровірусну терапію, хіміотерапію, а також, як можливий препарат для лікування ревматоїдного артриту та інших аутоімунних захворювань. На теперішній час, за окремими непрямыми, а іноді і прямими експериментальними, описаними в літературі, даними можна досить впевнено припускати багатофункціональність ІЛ-7. Але найкраще описано в літературі та опрацьовано експериментально, його терапевтична дія при солідній онкології, антибактеріальній резистентності і хронічних вірусних інфекціях [5-7]. Актуальним є розробка лікувально-профілактичних препаратів для відновлення імунітету під час гострих респіраторних захворювань [8]. Реалізація такого завдання може адресуватися до створення препаратів на основі ІЛ-7 людини назального застосування.

Зважаючи на сучасні досягнення молекулярної біології та біотехнології у галузі отримання білків медичного призначення найбільш оптимальним вважаємо підхід до отримання даного цитокіну на основі рекомбінантного продуцента [9-11].

Рекомбінантні білки, що плануються застосовувати у медицині із лікувальною чи діагностичною метою, мають відповідати специфічним вимогам, що відрізняє їх від тих білків, що використовуються виключно у науково-дослідних роботах. У той же час, специфіка використання

рекомбінантного білка (терапія чи діагностика) також накладають специфічні вимоги щодо їх стандартизації. Вкрай важливим є питання забезпечення стабільності рекомбінантного білка у тій чи іншій лікарській формі [12].

Враховуючи високий терапевтичний потенціал даного цитокіну важливим напрямом подальших розробок є створення різноманітних фармацевтичних форм на основі рекомбінантного ІЛ-7 людини (pІЛ-7), що забезпечуватимуть доставку pІЛ-7 та збереження його стабільності та біологічної активності [12-13]. При розробці препаратів на основі рекомбінантних білків основні проблеми, з якими стикаються розробники, пов'язані з біологічною нестабільністю білкових препаратів. Подібно до інших протеїнів pІЛ-7 у водних розчинах піддається механізмам хімічного розкладання, таким як протеоліз, окислення, дисульфідний обмін, олігомеризація, деамінування і фізичним механізмам, таким як агрегація, осадження і адсорбція. Подібні зміни впливають на термін придатності препарату на основі pІЛ-7 [12-13].

Як відомо, стабільність лікарських препаратів залежить від багатьох факторів: температури, рН, умов зберігання, освітленості, складу навколишньої атмосфери, способу приготування, допоміжних речовин, виду лікарської форми, особливо її агрегатного стану, упаковки тощо. Як правило, з метою стабілізації прийнято використовувати як хімічні методи – додавання стабілізаторів, антиоксидантів та консервантів, так і фізичні – захист від впливу факторів зовнішнього середовища, застосування високоочищених препаратів і допоміжних речовин, а також комбінації зазначених методів [12].

Характеристика отриманих за допомогою рекомбінантних технологій білків повинна включати визначення їх фізико-хімічних властивостей, біологічної активності, імунохімічних властивостей, чистоти та наявності домішок за допомогою відповідних сучасних методів, та є необхідною умовою для розробки повних і відповідних специфікацій. Валідація аналітичних методик являє собою процедуру експериментального доведення того, що методика придатна для розв'язання поставлених завдань. Оцінка придатності

аналітичних методик є одним із найважливіших елементів системи забезпечення якості продукції фармацевтичної та біотехнологічної галузей [13].

Таким чином, розробка біотехнологій створення препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та їх біоаналітична стандартизація є вкрай актуальними та пріоритетними завданнями сучасної промислової та аналітичної технології.

**Зв'язок роботи з науковими програмами.** Дисертаційна робота виконана на кафедрі промислової біотехнології КПП імені Ігоря Сікорського та у відділі регуляторних відносин, менеджменту якості і науково-технічних розробок ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» в рамках наступних науково-дослідних робіт: «Біотехнології створення та використання рекомбінантних білків та вивчення їх імунобіологічних та фармакологічних властивостей» (2012-15 рр., державний реєстраційний № 0114U004049), «Фармацевтична розробка субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та готових лікарських форм на її основі» (2014-15 рр., державний реєстраційний № 0114U004050), «Науково-методичне обґрунтування принципів біофармацевтичної продукції та організації її виробництва» (2017-18 рр., державний реєстраційний № 0116U007718). У даних комплексних роботах здобувач була відповідальним виконавцем робіт.

**Мета та задачі дослідження.** *Мета роботи* – наукове обґрунтування та розроблення біотехнології субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та назальної форми препарату на його основі, а також параметрів їх технологічної та аналітичної стандартизації.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні *задачі*.

1. Розробити технологію одержання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, придатної для виготовлення з неї нестерильних препаратів.

2. Розробити технологію одержання готового препарату назального застосування на основі субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

3. Дослідити біологічну активність рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях *in vitro* як основу для біологічної стандартизації препаратів на його основі.

4. Обґрунтувати параметри аналітичної стандартизації різних препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, розробити методи контролю їх якості та провести їх валідацію.

5. Провести дослідження стабільності різних препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

6. Провести перспективну валідацію технології виготовлення готового препарату рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на основі оцінки ризиків виробничого процесу.

*Об'єкт дослідження* – біотехнологічні підходи до створення препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та науково-методичне обґрунтування параметрів біоаналітичної стандартизації цих препаратів і їх валідації.

*Предмет дослідження* – розробка біотехнології створення препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та науково-методичне обґрунтування параметрів біоаналітичної стандартизації цього препарату і їх валідації.

*Методи дослідження* – мікробіологічні, біотехнологічні, молекулярно-біологічні, вірусологічні, імунологічні, фізико-хімічні та математичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Розроблено раціональну технологію біосинтезу (вихід – 0,9 мг/мл біомаси), а також виділення та очистки рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із високою біологічною активністю *in vitro*.

Вперше показано наявність безпосередньої протівірусної активності рІЛ-7 людини по відношенню до вірусу гепатиту С в умовах *in vitro* (CC<sub>50</sub> – 3 мкг/мл, ED<sub>50</sub> – 4,7 нг/мл, IS – 640) та доведено можливість використання відповідної методики для стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Вперше науково обґрунтовано технологію отримання назальної форми препарату на основі отриманого рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, а також принципи його аналітичної стандартизації із застосуванням фізико-хімічних, мікробіологічних та імунологічних методів.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення препаратів рекомбінантних білків терапевтичного призначення.

**Практичне значення отриманих результатів.** Проведено адаптацію та валідацію методики визначення біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із застосуванням моноклеарних клітин периферичної крові людини, що дозволило використовувати запропонований метод для рутинного аналітичного контролю якості препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Проведено перспективну валідацію технології отримання назального спрею на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок, яка підтвердила стабільність процесу та його відповідність критеріям прийнятності (акт апробації від ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» від 03.07.2017 р.) (Додаток А).

Для назальної форми рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини розроблено технічні умови ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний», на які отримано позитивний висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи від Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (№ 602-123-20-2/15716 від 19.05.2017 р.) (Додаток Б).

Науково-методичні рекомендації щодо аналізу ризиків технології назальних спреїв на основі рекомбінантних білків використовуються у ДП «Український медичний центр сертифікації» МОЗ України (м. Київ) при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентується постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів» (Додаток А).



Результати роботи впроваджено у викладання курсів «Медична біотехнологія» та «Розробка біофармацевтичної продукції та організація виробництва» на кафедрі промислової біотехнології КПІ імені Ігоря Сікорського (Додаток А).

**Особистий внесок здобувача.** Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилися спільно із науковим керівником.

Розробку молекулярної біотехнології одержання рІЛ-7 проводили спільно з к.б.н. О.Б. Горбатюк та Я.О. Похолоenko. Вивчення біологічної активності рІЛ-7 проводили спільно із д.м.н. С.Л. Рибалко, д.б.н. М.В. Коваленко, к.б.н. Д.Б. Старосилою, к.б.н. Ю.І. Порвою, к.б.н. С.Т. Дядюн. Отримання назальної форми препарату рІЛ-7 проводили спільно з д.фарм.н. Л.М. Андрюковою та к.фарм.н. О.Г. Фетісовою. Огляд літератури за окремими розділами проводили спільно з д.б.н. О.М. Дуганом, к.т.н. Ю.В. Горшуновим, к.т.н. Л.І. Ружинською, к.х.н. Н.Г. Марінцовою, В.В. Мотроненко.

Особисто автором описані результати досліджень, проведено їх аналіз та обговорення. Спільно із науковим керівником сформовано висновки.

Автор висловлює щиру вдячність науковому керівнику д.б.н. О.Ю. Галкіну, академіку НАМН України, члену-кореспонденту НАН України В.А. Кордюму та професору С.Л. Рибалко – за підтримку та цінні поради під час планування й виконання роботи.

**Апробація результатів роботи.** Основні положення роботи доповідались та обговорювались на: II Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія» (14-15 квітня 2016 р., м. Київ), X Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016 р., м. Київ), V Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (12-13 травня 2016 р., м. Київ), VII науково-практичній конференції з міжнародною участю

«Молодіжний форум з нанобіотехнологій-2016 (YouthNanoBioTech-2016)» (25-26 травня 2016 р., м. Київ).

**Публікації.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 14 праць, серед яких: 1 монографія, 7 наукових фахових статей (у т.ч. 2 статті у виданнях іноземних країн, 3 статті у вітчизняних журналах, які представлено у міжнародних наукометричних базах даних), 2 статті у інших наукових виданнях, 4 тези доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел (117 найменувань), двох додатків. Робота представлена на 180 сторінках друкованого тексту, містить 20 рисунків і 29 таблиць.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Обґрунтування біотехнологічних підходів отримання інтерлейкіну-7 людини рекомбінантного

#### 1.1.1. Будова та фізико-хімічні властивості ІЛ-7 людини

Інтерлейкін-7 (ІЛ-7) – це імунний цитокін, що відіграє центральну роль в розвитку та гомеостазі Т- і В-лімфоцитів. Ген ІЛ-7 людини (33 т.п.н.) знаходиться в довгому плечі 8 хромосоми в локусі q12-q13, включає в себе 6 екзонів і 5 інтронів, та має відкриту рамку зчитування 534 пар основ (рис. 1.1). На ньому транскрибуються молекули мРНК розміром 1,8 та 2,4 т.п.н. Кодує 177 амінокислот, у тому числі й сигнальний пептид, що складається з 25 амінокислот. Гомологія кодуєчих послідовностей людського і мишачого ІЛ-7 становить 81%, а 5' і 3' не кодуєчих - приблизно 60-70%. Хоча людський ІЛ-7 має активність в клітинах мишей, мишачий ІЛ-7 не здатний стимулювати людські пре-В-клітини [14,15].

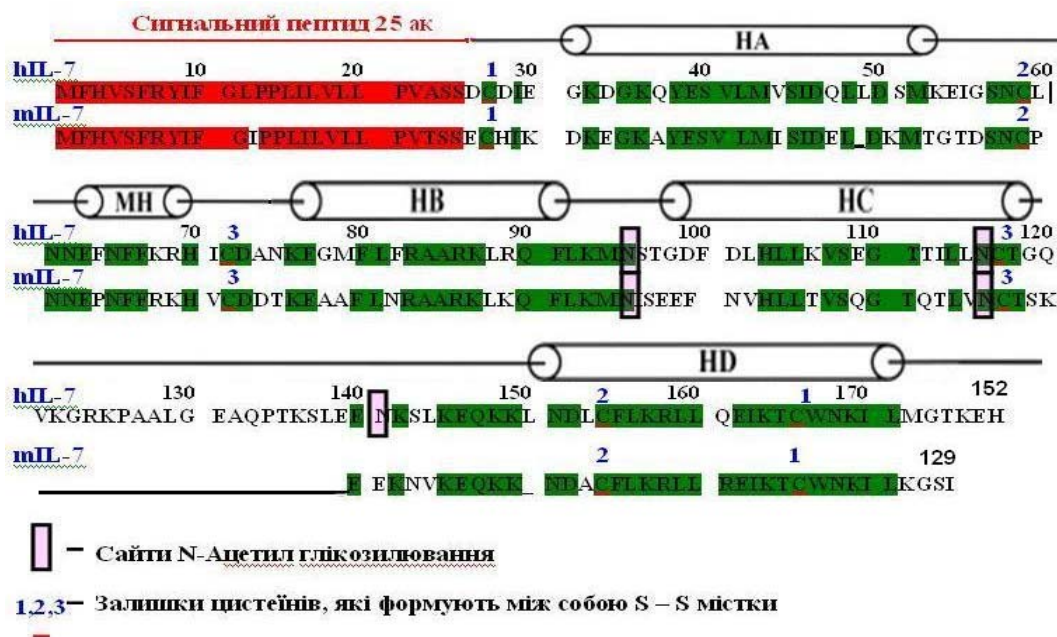


Рис. 1.1. Ген відповідальний за синтез ІЛ-7 людини [16]

Існують три додаткові варіанти сплайсингу в рамці, в результаті яких вилучається 3 або 5 екзон або обидва разом з 4 екзоном. Названі вони відповідно ІЛ-7δ3/4, ІЛ-7δ4/5 і ІЛ-7δ3/4/5. Крім того були знайдені 3 позарамкові варіанти сплайсингу: ІЛ-7(-56 п.о. Екзон 2), ІЛ-7δ4(-56 п.о. Екзон 2), і ІЛ-7δ3/4/5(-56 п.о. Екзон 2), в яких крім вищезгаданих вилучень екзонів, пропущені 56 п.о. на 3'-кінці 2 екзону [17,18].

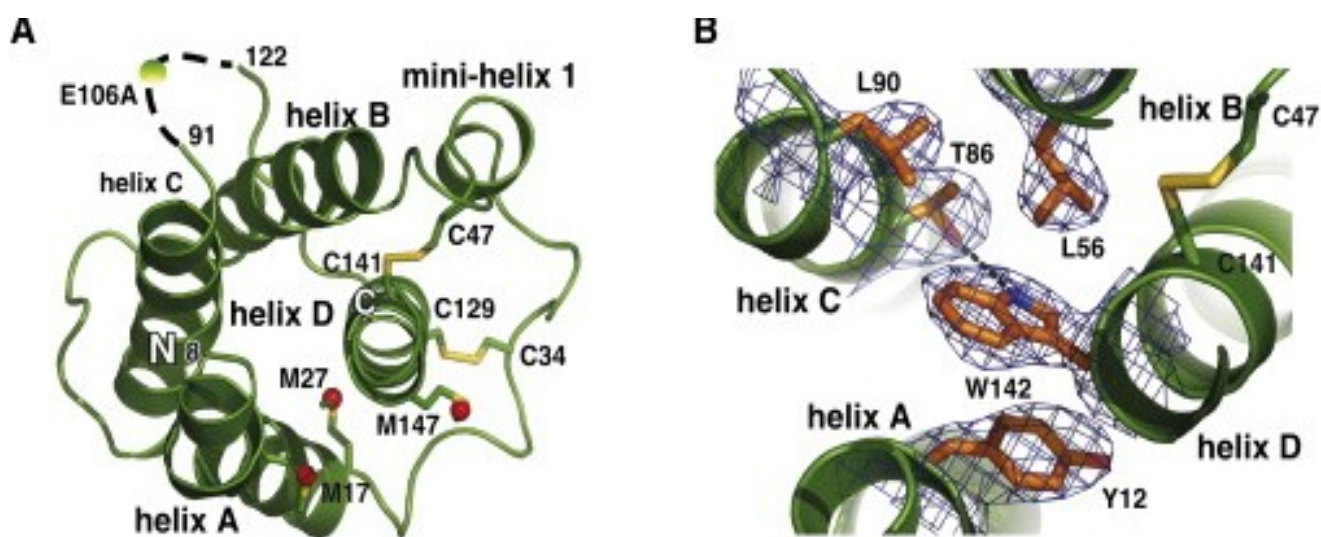
ІЛ-7δ4 варіант сплайсингу був знайдений у багатьох тканинах і не мав біологічної активності, але інші варіанти потенційно можуть бути залучені в модуляції ІЛ-7-опосередкованих біологічних ефектів. Подальші їх дослідження присвячені їх ролі в регуляції функцій ІЛ-7 і патогенезі лейкемії[19].

ІЛ-7δ4/5 здатен фосфорилювати сигнальний трансдуктор та активатор транскрипції-5 (STAT-5) в CD4+ та CD8+ Т-клітинах, запускаючи дозрівання тимоцитів і виживання Т-клітин. В онкологічно хворих людей був помічений синтез аномальних ізоформ ІЛ-7 в тих тканинах де його не має бути. Виходячи з цього, альтернативно сплайсований ІЛ-7 розглядається як маркер для діагностичних цілей [20,21].

ІЛ-7 людини – це одноланцюговий глікопротеїн, амінокислотна послідовність якого передбачає молекулярну масу (ММ) 17,4 кДа, але в результаті глікозилювання утворюється форма з ММ 25 кДа. Молекула ІЛ-7 містить 4 альфа-спіралі (А, В, С, D), що упорядковані у просторі за допомогою дисульфідних містків, а також одну міні-спіраль (mini-helix 1) (рис. 1.2). Гідрофобне ядро ІЛ-7 утворене амінокислотами Leu 16, Met 17, Ile 20, Leu 23, Leu 24 (спіраль А), Phe 55, Leu 56, Ala 59, Leu 63, Phe 66(спіраль В), Leu 79, Val 82, Thr 86, Leu 89, Thr 93 (спіраль С), Leu 128, Leu 131, Leu 135, Ile 138 and Trp 142 (спіраль D). Як характерно для інших гематопоеитинів, деякі залишки, що не належать до спіральних ділянок, додають свої латеральні ланцюги до ядра. У випадку моделі цими залишками є Met 27, Phe 39, Phe 41, Phe 42 (петля АВ) і Phe 75 (петля ВС) [16,22,23].

Амінокислотна послідовність ІЛ-7 містить 6 залишків цистеїну, які здатні утворювати три внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки. Перший з'єднує N-кінець ланцюга і спіраль C Cys 1-4 (Cys 2-Cys 92), другий формується між петлею AB і початком спіралі D Cys 3-6 (Cys 47-Cys 141). Третій дисульфідний зв'язок знаходиться між петлею AB і нижньою частиною спіралі D Cys 2-5 (Cys 34-Cys 129). Молекула також має 3 сайти N-глікозилювання в положеннях Asn 95, Asn 116 і Asn 141 [16].

Коефіцієнт молекулярної екстинції ІЛ-7 – 7690, ізоелектрична точка – 8,52, заряд при рН7 складає 3,51 [9].



**Рис. 1.2. Структурна модель неглікозилизованого ІЛ-7 [16]:**

А) Тривимірна модель молекули ІЛ-7; В) гідрофобне ядро ІЛ-7

### **1.1.2. Обґрунтування біотехнологічних підходів до створення штамму-продуцента та отримання рІЛ-7**

Обґрунтування вибору продуцента. Посилаючись на сучасні досягнення молекулярної біології та біотехнології найоптимальнішим рішенням при розробці технології отримання людського інтерлейкіну-7 являється створення рекомбінантного продуцента для синтезу описаного цитокіну. За більш ніж 20 років з моменту відкриття та описання людського ІЛ-7 вченими створено

багато рекомбінантних систем експресії ІЛ-7 людини на основі прокаріотичних та еукаріотичних продуцентів. Конкретні приклади яких детально описані в таблиці 1.1.

Для переносу генетичної послідовності, що кодує синтез ІЛ-7, використовують векторну ДНК. Вектором може бути плазміда, вірус, фаг, косміда або епісома. Вектор зазвичай містить регуляторні елементи або послідовності для контролю експресії рІЛ-7. Регуляторна послідовність може бути обрана серед промоторів, енансерів, сайленсерів, тканеспецифічних сигналів, пептидних сигналів, інтронів, термінаторів, поліА послідовностей або їх комбінацій. Ці регуляторні елементи можуть бути отримані з тваринного, рослинного, бактеріального, дріжджового, бактеріофагового або вірусного генетичного матеріалу. Вектор може містити не один промотор, а декілька. Вектор повинен містити сайт початку реплікацій та маркерний ген [24].

Виходячи з наведених даних, для синтезу рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, на нашу думку, найбільш технологічним та економічно вигідним є створення продуцента на основі прокаріотичного організму *E.coli* та системи експресії сконструйованої за допомогою плазмідного вектора. Оскільки цей мікроорганізм є найдетальніше вивченим, не потребує коштовних середовищ для культивування та така система експресії дозволяє отримувати високі виходи цільового білка [9,24,25]. Як приклад, можна розглянути систему експресії сконструйовану за допомогою плазмідного вектора *pACYC184* та штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) (рис. 1.3). Основні переваги запропонованої системи експресії полягають в наступному:

- економічно вигода, так як для культивування необхідні простого складу, не дорогі поживні середовища;
- генетичні, молекулярно-біологічні, біохімічні та фізіологічні властивості цього організму детально вивчені;
- транскрипція структурного гена в зазначеній системі регулюється *lacUV5* промотором  $\beta$ -галактозидазного оперону, що дає можливість використовувати схему аутоіндукції для експресії білка, що значно здешевлює затрати.

Таблиця 1.1.

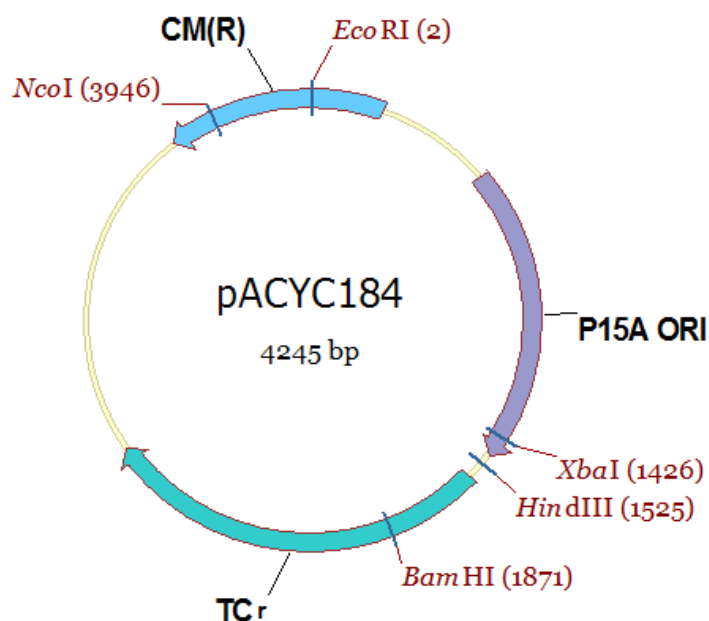
**Системи експресії, що можуть використовуватися для синтезу рІЛ-7 [9, 25, 28-32]**

Продуцент	Вектор	Регуляторна послідовність	Маркерний ген	Переваги даної системи	Недоліки даної системи
Прокаріотичні системи					
<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , різні види родів <i>Streptomyces</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>	Плазміда	Промотор T7 РНК полімерази (pT7), TAC промотор (pTAC), Trp промотор, Lac промотор, Tre промотор,	Ген стійкості до антибіотика	Економічно вигідний та швидкий спосіб отримання багатьох білків. <i>E.coli</i> – найдетальніше вивчений організм в порівнянні з іншими, що полегшує роботу з ним. Високі виходи цільового білка	В більшості випадків цільовий білок напрацьовується в вигляді тілець включень в хаотично-розгорнутій формі, що потребує додаткових технологічних етапів
	Вірус або фаг	PhoA промотор			Потребує урахування вимог вірусної безпеки
Еукаріотичні системи					
Дріжджові клітини - <i>Pichia pastoris</i>	Лінеризований вектор pPICZαB	Оксидазний промотор I	Ген стійкості до зеоцину	Напрацювання білка в секретованій формі	Цільовий білок напрацьовується в глікозилізованій формі, але тип глікозилювання не відповідає людському

Продуцент	Вектор	Регуляторна послідовність	Маркерний ген	Переваги даної системи	Недоліки даної системи
Культури клітин комах – <i>Trichoplusia ni</i> та <i>Spodoptera Frugiperda</i>	Бакуловірус на векторна система експресії	Актиновий промотор OpIE2	Ген стійкості до зеоцину	Напрацювання білка в секретованій формі	Коштовні середовища для культивування продуцента. Значна тривалість процесу напрацювання цільового білка
Культури клітин ссавців: лінії нирок мавп фібробластів <i>COS-7</i> , клітинна лінія з мишиної пухлини молочної залози <i>C127</i> , клітинна лінія мишачих ембріональних фібробластів <i>3T3</i> клітини яєчника китайського хом'ячка <i>CHO</i> , людські клітини ракової пухлини шийки матки <i>HeLa</i> , клітини нирки дитинчати хом'ячка <i>BHK</i> , людські епідермальні кератиноцити <i>HEK-293</i>	Плазмідні вектори pCR, pcDNA-hPS, аденовірусні вектори	Вірусні промотори, промотори внутрішніх генів та гібридні промотори	Селективний маркерний ген стійкості до неоміцину G418, канаміцину або зеоцину	Цільовий білок є гуманізованим. Ступінь чистоти отриманого білка набагато вищий ніж у білка отриманого за допомогою систем експресії на основі прокаріотичних та дріжджових клітин	Висока вартість напрацювання цільового білка. Потребує урахування вимог вірусної безпеки



- відсутність генів *Lon* і *OmpT*, відповідальних за синтез клітинних протеаз, які руйнуватимуть чужорідний білок, що синтезується клітинами [26,27].



**Рис. 1.3. Карта pACYC184 вектора клонування:** CM(R) – резистентність до хлорамфеніколу, TCr – резистентність до тетрацикліну, P15A ORI – сайт початку реплікації, Bam HI, Hind III, Xba I, Eco RI, Nco I – сайти рестрикції відповідними ендонуклеазами [27]

Ферментація та методи індукції синтезу pIL-7. Процес ферментації має дві стадії:

- 1) отримання інокуляту та індукція синтезу цільового білка;
- 2) виділення та очистка цільового білка.

Інокулят отримують шляхом вирощування продуцента на простому середовищі, що є оптимальним для вирощування бактерій. Середовище для вирощування *E.coli* повинно містити іони  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , мікроелементи та джерело вуглецю (наприклад, глюкоза) [26]. Для культивування штаму *E.coli* – продуцента рекомбінантного ІЛ-7 людини, можливим є використання одного з середовищ стандартного складу, що зазвичай використовується для вирощування бактерій, наприклад:

- середовище Luria-Bertani (LB) (1% триптон, 0,5 % дріжджового екстракту та 1% NaCl);
- середовище 2YT (1,7% бактотриптон, 1% дріжджового екстракту та 0,5%  $MgSO_4$ );
- середовище SOC (2% бактотриптон, 0,55% дріжджового екстракту, 1% NaCl та 0,25% KCl).

До складу одного з стандартних середовищ обов'язково додають джерело вуглецю – глюкозу, в концентрації та хлорамфеніколу для селекції трансформованого штаму [33].

Як свідчать літературні джерела [33] найоптимальнішим середовищем для вирощування рекомбінантних штамів *E.coli* є середовище 2YT. На даному середовищі зазвичай інкубують продуцент при температурі 36 – 38°C, при швидкості обертів від 100 до 160 об/хв. протягом 2-3 годин до досягнення культурою середини експоненційної фази росту, що визначається досягненням культуральною рідиною оптичної густини 0,6-1,0 OD<sub>590</sub>[34,35].

Індукцію синтезу рІЛ-7 можливо проводити двома методами:

- додавання хімічного індуктора ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіоґалактопіранозід (ПТГ) в концентрації від 0,1 мМ до 2 мМ;
- ферментація на середовищі для аутоіндукції з лактозою.

Для індукції синтезу рІЛ-7, з економічної точки зору, кращим технологічним рішенням буде останній метод, оскільки такий підхід значно знижує собівартість процесу ферментації. Згідно літературних даних[36] для забезпечення процесу аутоіндукції, з виходом цільового продукту більшим ніж у випадку індукції ПТГ до середовища для ферментації повинні входити наступні додаткові компоненти:  $(NH_4)_2SO_4$ , або  $NH_4Cl$ ;  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , D-мальтозу,  $MgSO_4$ , гліцерол, глюкозу,  $\alpha$ -лактозу, хлорамфеніколу,  $NaHCO_3$ , можливе також додавання слідових металів (залізо, манган, кобальт, цинк, нікель, мідь та молібден в вигляді солей). Інокують посівний матеріал на середовище даного складу у співвідношенні 1:1000 та вирощують при оптимальній температурі на шейкері при постійному перемішуванні протягом

16-22 годин, після чого центрифугують, збирають біомасу та зберігають при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  [36-38].

Виділення та очистка рекомбінантного ІЛ-7 людини. Для проведення очистки рекомбінантного ІЛ-7 людини від білків клітин-продуцентів необхідно проводити аналіз локалізації в них цільового білка, зазвичай в системах експресії такої конструкції, як описано вище, цільовий білок накопичується в нерозчинній фракції бактеріальної цитоплазми – в так званих тільцях включення.

Якщо цільовий білок синтезується клітиною у вигляді тілець включення (ТВ), то подальший технологічний процес буде включати наступні етапи [39]:

- 1) Руйнування клітин та виділення ТВ;
- 2) Відмивка та центрифугування ТВ;
- 3) Ренатурація, тобто розчинення ТВ;
- 4) Рефолдінг, що супроводжується утворенням правильно замкнутих дисульфідних зв'язків, в ході чого білок набуває нативної конформації;
- 5) Очистка.

Для виділення ТВ, в яких знаходиться синтезований рІЛ-7, спершу потрібно зруйнувати клітину стінку продуцента. Для руйнування клітин використовують різноманітні хімічні, біологічні та фізичні методи. Всі процедури повинні бути досить жорсткими, щоб зруйнувати клітинну стінку, і разом з тим досить м'якими, щоб виключити денатурацію білка. У грамнегативних бактерій клітинна стінка тонше і покрита зовні шаром ліпідів [2].

Хімічні методи руйнування клітинних стінок включають обробку лугом, органічними розчинниками або детергентами. Якщо білковий продукт не руйнується при рН від 10,5 до 12,5, то можна досить ефективно лізувати великі кількості бактеріальних клітин [2].

Обробка органічними розчинниками являє собою простий і недорогий спосіб руйнування клітин, який використовується для виділення ферментів з мікроорганізмів. Однак, щоб переконатися в тому, що в підібраних умовах,

білковий продукт не денатурує, зазвичай проводять попереднє тестування. Під дією детергентів в мембранах бактеріальних клітин утворюються пори, через які білки та інші молекули виходять з клітин. На жаль, застосування детергентів погіршує техніко-економічні характеристики технологій, в більшості випадків в їх присутності білки денатують, а крім того, вони можуть забруднювати кінцевий продукт[39].

Основним біологічним методом руйнування клітин мікроорганізмів є лізис за допомогою ферментів. Так, лізоцим яєчного білка легко гідролізує клітинні стінки грампозитивних бактерій. Для руйнування клітинних стінок грамнегативних бактерій використовують лізоцим і етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА). Ферментативна обробка високоспецифічна, а лізис проходить в м'яких умовах[2].

Клітини можливо руйнувати й фізичними методами: немеханічними (наприклад, за допомогою осмотичного шоку або швидкого багаторазового заморожування і розморожування) або механічними (обробкою ультразвуком, за допомогою шарового млина, гомогенізація під тиском). Навпаки, механічне руйнування високоефективне, що робить його більш привабливим [38].

Фізичні немеханічні методи, такі як метод багаторазового заморожування та розморожування є недостатньо ефективним, так як після цієї процедури багато клітин залишаються незруйнованими. та довготривалим по часу.

Фізичні методи з використанням ультразвуку або шарового млина досить ефективно в плані руйнування клітин, але під час обробки клітинної маси цими методами може призводити до її нагрівання, що може спричинити денатурацію білка, а організувати процедуру охолодження клітинної суспензії під час обробки ультразвуком в великих об'ємах досить проблематично, тому використання даних методів для промислового виробництва є недоцільним [2,40].

Для промислового виробництва, на нашу думку, найбільш прийнятним у даному випадку, є біохімічний метод руйнування клітин лізоцимом та ЕДТА, з наступним додаванням ДНКзи для руйнування клітинної ДНК, та відмивка в

серії буферів з вмістом детергентів таких як ЕДТА, тритон X-100 та дезоксихолат натрію для покращення очистки та подальшого розчинення тілець включень [2,41].

Наступним етапом технології є процедура розчинення ТВ, де рекомбінантні білки знаходяться в агрегованій, неактивній формі. Технологічний процес отримання рекомбінантного ІЛ-7 людини може включати розчинення тілець включення в присутності хаотропного агента (наприклад, високих концентрацій сечовини, гуанідину гідрохлориду або тіоціонатних солей) або детергенти (додецилсульфат натрію, бромід цетилтриетиламонію, N-лаурилсаркозин, твін-80). За необхідності в солюбілізуючий буфер додають відновлюючі агенти (2-меркаптоетанол, дітіотрієтол або цистеїн). Для видалення іонів металів, що призводять до небажаного окислення тіольних груп білків до складу солюбілізуючого буферу можуть бути додані хелатуючі реагенти, такі як ЕДТА в концентрації від 1 до 10 мМ. Крім цього, для розчинення ТВ, використовують лужні або кислі буферні розчини, в комбінації з вищеперерахованими умовами [42,43].

Згідно літературних даних [44] при використанні 8М розчину сечовини в якості хаотропного агента, великий відсоток сторонніх домішок залишається в нерозчиненому вигляді, що полегшує подальшу очистку [42].

Наступний етап технології отримання рекомбінантного білка – рефолдінг (видалення з солюбілізаційного буфера денатуруючого агента) отриманого білка. Для цього можливе використання декількох підходів, таких як розведення, діаліз, діафільтрацію, а також хроматографічні методи [40].

При розведенні денатуруючий буфер зазвичай вносять прямо в розчин солюбілізованого білка. Цей метод має багато недоліків, які полягають в необхідності наступного концентрування, а також в високому виході продуктів неправильного фолдінгу, тому в промисловості цей метод не використовують.

Методики з використанням діалізу ґруновані на відносно повільному видаленні солюбілізуючого реагенту через мембрану з фіксованим розміром пор. Оскільки рівновага в системі встановлюється довго, то цей процес рідко

використовують в промислових масштабах. Крім того, при досягненні проміжних концентрацій денатуруючих агентів можлива агрегація білка [42].

Для промислових цілей більш застосований метод діафільтрації. При даному підході видалення денатуруючого агенту не лімітується швидкістю дифузійного процесу, але значні рівні накопичення денатурованого білка на мембрані обмежують широке використання цього методу.

В промислових масштабах зазвичай використовують хроматографічні методи, такі як металхелатуюча, іонобмінна, оберненофазова хроматографія, а також гель-фільтрація. Перевага хроматографічних методів полягає в можливості проведення процесу в умовах, при яких білок знаходиться в денатурованому стані.

Гель-фільтрація є швидким та ефективним методом, який широко використовується в промисловості. Зазвичай для рефолдингу методом гель-фільтрації застосовують буфери з вмістом амінокислот (гліцин, аргінін), детергентів в низьких концентраціях (0,1 – 0,5 % NP-40; 0,1 – 0,005% твін-20), а також певні аніони (фосфати, сульфати). Ці реагенти фактично не впливають на швидкість рефолдингу, але значно зменшують вірогідність утворення агрегатів, приймаючи участь в дестабілізації міжмолекулярних та гідрофобних взаємодій [42,45].

Отже, виходячи з усього вище сказаного, найоптимальнішим варіантом для рефолдингу рекомбінантного ІЛ-7 людини є метод гель-фільтрації на колонці з сорбентом з використанням буферного розчину з вмістом L-аргініну гідрохлориду та Твін-80. Це швидкий та ефективний метод, що не призводить до значного розведення білка, з успіхом застосовується для білків, які не утворюють нерозчинних проміжних продуктів. Буфер даного складу підвищує ефективність проходження процедури та зменшує вірогідність утворення агрегатів [44,46].

На наступному етапі до отриманого білка необхідно додати окислювально/відновлювальну пару низькомолекулярних тіолів для формування дисульфідних зв'язків, тобто для проведення процедури

ренатурації. Наприклад: відновлений/окислений гутатіони, дітіотрієтол/окислений глутатіон, дітіоеритрітол/окислений глутатіон або цистеїн/цистин. Рекомендовані концентрації для формування дисульфідних зв'язків складають 1-10 мМ відновленого тіолу та співвідношення відновленої та окисленої форм від 10:1 – 3:1 [42,47].

Подальшу процедуру очистки полягає в послідовній хроматографічній очистці, з використанням аніоно та катіонообмінних сорбентів. Для першого етапу очистки можливим є використання Q сефарози (сильний аніонообмінник) в поєднанні ДЕАЕ-сефарозою (слабкий аніонообмінник) – на цьому етапі проводиться основна очистка від усіх сторонніх домішок, другий етап – очистка на колонці з сильним катіонообмінним сорбентом з метою заміни буфера на буфер для готового препарату [39,50].

## **1.2. Принципи стандартизації препаратів на основі рекомбінантних білків**

Рекомбінантні білки, що плануються до застосування із лікувальною метою, мають відповідати специфічним вимогам, що відрізняє їх від тих білків, що використовуються виключно у науково-дослідних роботах. Характеристика отриманих за допомогою рекомбінантних технологій білків повинна включати визначення їх фізико-хімічних властивостей, біологічної активності, імунохімічних властивостей, чистоти та наявності домішок за допомогою відповідних сучасних методів, та є необхідною умовою для розробки повних і відповідних специфікацій.

Розробку специфікації та методів контролю якості необхідно проводити посилаючись на вимоги наступних нормативних документів: Державна Фармакопея України, Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.2:2004, «Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності» та Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.3:2013 «Лікарські засоби. Специфікації: методи випробувань

та критерії прийнятності для біотехнологічних/біологічних продуктів (ICH Q6B)» [51,52].

Детальне визначення характеристик рекомбінантних препаратів зазвичай має виконуватися на етапах розробки складу та технології, у разі необхідності, під час значних змін у виробничому процесі. Під час розробки нового препарату необхідною умовою є проведення порівняння з відповідним стандартним препаратом, якщо такий існує та з природнім аналогом, якщо це можливо та доцільно. Для використання у рутинному аналізі доцільно розробляти належним чином охарактеризовані власні стандартні матеріали, які використовуватимуться для біологічного та фізико-хімічного випробування виробничих та/або дослідних серій. До переліку обов'язкових методів для контролю рекомбінантних білків доцільно включити випробування, специфічні для конкретного білка з обґрунтуванням припустимого діапазону для критеріїв прийнятності [52].

Специфікації для активної речовини та готового препарату є одним з елементів загальної стратегії контролю, яка включає контроль вхідних матеріалів та допоміжних речовин, контроль у процесі виробництва, валідацію процесів, випробування стабільності і контроль однорідності серій. Тільки при застосуванні всіх цих елементів може бути гарантована належна якість активної речовини/готового препарату.

Певні випробування, що проводяться у ході виробничого процесу, можуть бути достатніми для підтвердження відповідності вимогам специфікації, якщо такі випробування включені у специфікацію та якщо критерії прийнятності ідентичні вимогам, встановленим у специфікації на активну речовину або лікарський препарат.

Підходи до розробки специфікації на активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) та готові лікарські форми (ГЛФ), що містять в своєму складі зазначений АФІ дещо відрізняються. Деякі показники якості, не є обов'язковими та доцільними для ГЛФ, особливо якщо цей показник застосовують для контролю АФІ, що входить до ГЛФ. Далі наведемо перелік необхідних показників якості



рекомбінантних білків та проаналізуємо доцільність застосування кожного з показників у випадку АФІ та ГЛФ.

*Опис.* Чітко вказують фізичний стан (наприклад твердий, рідкий) та колір активної речовини та колір білкової субстанції. Даний показник являється актуальним як у випадку АФІ, так і ГЛФ. У нашому випадку субстанцію рІЛ-7 отримують в водному розчині, що має вигляд прозорої безбарвної рідини, без механічних включень видимих неозброєним оком. Що стосується ГЛФ, то все залежить від фармацевтичної форми в якій випускається препарат.

*Ідентифікація.* Ідентифікаційні випробування мають бути високого ступеня специфічними та мають ґрунтуватися на унікальних аспектах молекулярної структури та/або інших специфічних властивостях білка. Ідентифікаційні випробування можуть включати більш ніж одну складову (фізико-хімічні, біологічні та/або імунохімічні). Очевидно, що ідентифікація цільового білка є безальтернативним тестом як для АФІ так і для ГЛФ [51].

Одним із найпростіших підходів до ідентифікації рекомбінантного білка є визначення його молекулярної маси. Молекулярну масу (або розмір) можливо визначати використовуючи методи ексклюзивної хроматографії (ДФУ 2.0, 2.2.30), електрофорезу в поліакриламідному гелі за відновлювальних або невідновлювальних умов (ДФУ 2.0, 2.2.31), мас-спектрометрії (ДФУ 2.0, 2.2.43) та інших відповідних методів аналізу [53,54].

Інший можливий метод ідентифікації - визначення ізоформного складу, який визначають методом ізоелектричного фокусування (ДФУ 2.0, 2.2.54) або іншими відповідними методами [55,56].

Коефіцієнт екстинкції (або молярної абсорбції) також може бути використано для встановлення автентичності білкового продукту. У більшості випадків бажано визначати коефіцієнт екстинкції (або молярної абсорбції) для цільового продукту за певної довжини хвиль в ультрафіолетовій чи видимій областях (наприклад 280 нм). Коефіцієнт екстинкції визначають методом відповідної спектрофотометрії (ДФУ 2.0, 2.2.25) за розчином продукту з

відомим вмістом протеїну, що визначений такими методами аналізу, як аналіз амінокислотного складу або визначення азоту тощо [57,58].

Електрофоретичний профіль є одним із найбільш застосованих методів ідентифікаційної характеристики рекомбінантних білків будь-якого призначення. Електрофоретичний профіль та дані щодо однорідності та чистоти можна отримати за допомогою таких методів, як електрофорез в поліакриамідному гелі (ДФУ 2.0, 2.2.31), ізоелектричне фокусування (ДФУ 2.0, 2.2.54), електрофорез в поліакриамідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДФУ 2.0, 2.2.31), імуноблоттінг, капілярний електрофорез (ДФУ 2.0, 2.2.31) [55,56,59,60].

Хроматографічний профіль є одним із найбільш специфічних методів ідентифікації. Хроматографічний профіль та дані щодо ідентичності, однорідності і чистоти можна встановити з використанням таких методів, як ексклюзійна хроматографія (ДФУ 2.0, 2.2.30), гель проникна, гель-фільтрація (ДФУ 2.0, 2.2.29), електрофорез (ДФУ 2.0, 2.2.31), афінна хроматографія, тощо [60-64].

Виявлення специфічної активності також можна віднести до ідентифікаційних методом контролю якості рекомбінантних білків, як для АФІ, так і для ГЛФ.

Спектральний профіль також специфічний метод ідентифікації, але в порівнянні з іншими методами застосовується рідше. Ультрафіолетові та видимі спектри поглинання визначають по мірі необхідності. Структури вищого порядку продукту, за необхідності, вивчають з використанням таких методів, як спектрометрія ядерного магнітного резонансу (ДФУ 2.0, 2.2.33), круговий дихроїзм тощо [65,66].

Для ідентифікації АФІ та ГЛФ на основі рІІ-7, можливе використання будь-якого з перелічених вище методів, але з точки зору ефективності та техніко-економічних показників доцільне використання наступних методів: ексклюзійна хроматографія, електрофорез в поліакриамідному гелі за відновлювальних/невідновлювальних умов та тест на специфічну активність.

Аналіз з використанням методу ексклюзивну хроматографію можливо проводити в фосфатному (рН 6,8) чи ацетатному буфері (рН 5,0) з додаванням 0,1 М L-аргініну та 0,1% твіну-80, використовуючи систему вискоєфективної рідинної хроматографії з колонками для ексклюзійної хроматографії, такими як колонка з гідрофільним силікагелем для рідинної хроматографії із розміром частинок 5 мкм, що придатна для розділення білків з молекулярними масами від 15 до 600 кДа. Детекцію піків проводять шляхом моніторингу при довжині хвилі 280 нм. Чистоту рІЛ-7 розраховують як співвідношення площі виявленого основного піку до загальної площі усіх виявлених піків. Ідентифікацію проводять за часом утримування основного піку, що може дещо відрізнятися в залежності від розмірів колонки та умов проведення експерименту. Для колонки довжиною 300 мм та діаметром 7,8 мм G3000SWXL (TosoHaas, Montgomeryville, PA) час утримування основного піку складає  $21,7 \pm 0,5$  хв [32].

Електрофоретичний аналіз доцільно проводити у 13 % ДСН-поліакриламідному гелі з переривчастою буферною системою в відновлювальних (додавання  $\beta$ -меркаптоетанолу) та невідновлювальних умовах (концентрація поліакриламідного гелю залежить від молекулярної маси білка, який аналізують).

Тестування біологічної активності рІЛ-7 можна проводити на мононуклеарних лейкоцитах периферичної крові людини або на перевиваємі мишині пре-В-клітинні лінії 2E8 (ATCC® TIB-239™) [67]. Якщо для тестування використовують мононуклеарні клітини (моноцити та лімфоцити), то спочатку необхідно провести їх виділення, для цього отримують кров здорових донорів середнього віку. Клітини виділяють за стандартною методикою [68]. Після цього фракцію мононуклеарних клітин (моноцити і лімфоцити) необхідно стимулювати фітогемаглютиніном для того, щоб їх активувати. Після активації клітини проліферують та експресують на поверхні рецептор до ІЛ-7, що на наступному етапі дозволить визначити активність рІЛ-7. На наступному етапі клітини інкубують з отриманим рІЛ-7 в різних

концентраціях від 0,25 нг/мл до 10 нг/мл та стандартом рІЛ-7 в таких же концентраціях та вимірюють їх проліферацію за допомогою МТТ-тесту. МТТ-тест – це тест на активність клітинної НАДФ залежної оксидоредуктази, яка перетворює 3-(4,5-диметилтіазол-2-ил)-2,5-дифенілтетразол бромід (МТТ) на формазан, який вимірюється колориметрично [69,70]. Тому результати МТТ-тесту можна використовувати для визначення кількості життєздатних клітин. За отриманими даними будують криву росту культури клітин, для чого по осі абсцис відкладається десятковий логарифм концентрації рІЛ-7, а по осі ординат – відношення поглинання контрольними зразками до поглинання експериментальних. На кожній кривій визначають прямолінійну ділянку, що характеризується експоненційним ростом культивованих клітин у відповідь на дію рІЛ-7. На цій ділянці вимірюють середню точку, проекція з якої на вісь абсцис визначає половину ефективної дози (Effective dose, ED<sub>50</sub>). Перевагою такого методу вимірювання активності є те, що можна уникнути неточності, пов'язаної із індивідуальними особливостями клітин кожного донора та отримати абсолютно достовірні дані.

Значення специфічної активності розраховують за формулою:  $1000000/ED_{50}(\text{нг/мл})$ , і отримують значення в одиницях на мг білка.

*Чистота та домішки.* Абсолютну чистоту продукту отриманого рекомбінантним шляхом важко визначити, а результати значною мірою залежать від застосованого методу аналізу. Тому чистоту активної речовини, як правило, оцінюють за допомогою набору аналітичних методів. При виборі та оптимізації аналітичних методів основним є можливість відокремлення цільового продукту від продукт-зв'язаних речовин та домішок. Домішки, що виявляються у таких продуктах, класифікуються, як процес-зв'язані та продукт-зв'язані домішки [51].

Більш детально зупинимося на процес-зв'язаних домішках та контамінантах. Такого роду домішки утворюються під час виробничого процесу і підрозділяються на три головні категорії: отримані з культури клітин, отримані з субстрату, та отримані на подальших стадіях виробництва. Домішки,

отримані з культури клітин, включають, але не обмежуються протеїнами, отриманими з організму хазяїна, нуклеїновими кислотами (геном клітин хазяїна, вектор або повна ДНК). Для протеїнів клітин хазяїна, як правило, використовують чутливі методи, наприклад імуноаналіз, здатний визначати широкий діапазон протеїнових домішок. При імуноаналізі поліклональні антитіла, що використовуються у тесті, створюються імунізацією підготовленим клітинним продуктом, виключаючи продукт-кодуючий ген, злиттям (гібридизацією) клітин, або іншими придатними клітинними лініями. Рівень ДНК клітин хазяїна можна визначити прямим аналізом продукту (наприклад, метод гібридизації). Для уникнення необхідності встановлення критеріїв прийнятності для домішок, отриманих із субстрату клітин, таких як нуклеїнові кислоти та протеїни клітин хазяїна, інколи можуть проводитися точні дослідження, що включають пікові експерименти у лабораторних масштабах з метою демонстрації видалення цих домішок [51]. Даний тип домішок достатньо визначати лише в АФІ.

В субстанції рІЛ-7, отриманої напрацюванням цільового білка за допомогою прокаріотичних клітин *E. coli* в ТВ, доцільним буде проводити визначення наступних процес зв'язаних домішок отриманих з організму хазяїна: залишкова ДНК клітини хазяїна *E. coli* або вектора (не повинні перевищувати 10 нг/мг цільового білка) та залишкові білки клітини хазяїна *E. coli* (не повинні перевищувати 10 нг/мг цільового білка). Зазначені аналізи найчастіше проводять методом імуноферментного аналізу, для чого зазвичай використовують стандартні комерційні набори, які є в асортименті багатьох біотехнологічних компаній. Ця методика вирізняється високою чутливістю, та дає змогу визначати зазначені домішки, в кількості від 1 пг на 1 мг цільового білка [51].

Домішки, отримані з субстрату, зазвичай включають, але не обмежуються індукторами, антибіотиками, сироваткою та іншими компонентами живильного середовища.

Домішки, отримані на подальших стадіях виробництва, включають, але не обмежуються ферментами, хімічними та біохімічними реагентами, неорганічними солями, розчинниками, носіями, лігандами та іншими вилужуваними речовинами (наприклад, у випадку рІЛ-7, аналізуючи етапи технологічного процесу отримання білка з ТВ *E. coli*, такими домішками можуть бути гуанідин, 1,4-дитіотриетол, окислювачі та відновлювачі).

Далі більш детально розглянемо інший тип домішок, це продукт-зв'язані домішки, включаючи продукти розпаду. Продукти розпаду, що утворюються у значних кількостях під час виробництва та/або зберігання, необхідно перевіряти та контролювати на відповідність встановленим критеріям прийнятності. Такого роду домішки можуть являти собою усічені форми, інші модифіковані форми, а також агреганти. Аналіз цього типу домішок доцільно проводити не тільки в АФІ, а й у ГЛФ, оскільки вони можуть виникнути і в процесі зберігання АФІ, і в процесі виробництва ГЛФ [71].

Усічені форми можуть утворюватися завдяки дії гідролітичних ферментів або хімічних речовин, що каналізують розщеплення пептидних зв'язків. Вони можуть виявлятися за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ДФУ 2.0, 2.2.29) або електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДФУ 2.0, 2.2.31). Залежно від властивостей молекулярних варіантів може бути застосовано пептидне картування (ДФУ 2.0, 2.2.55) [53-55].

До інших модифікованих форм можна віднести деамідовані, ізомеризовані, з неспряженим S-S-зв'язком (містком), окислені або перетворені кон'юговані форми (наприклад глікозилювані, фосфорилувані), які можна виявити та охарактеризувати за допомогою методів рідинної хроматографії (ДФУ 2.0, 2.2.29), електрофорезу (ДФУ 2.0, 2.2.31) [53-55].

Агреганти являють собою димери та більш складні структури цільового продукту [51]. Вони, як правило, утворюються з цільового продукту та продукт зв'язаних речовин та кількісно визначаються за допомогою відповідних

аналітичних методів (наприклад, ексклюзійної хроматографії (ДФУ 2.0, 2.2.30), капілярного електрофорезу (ДФУ 2.0, 2.2.31)) тощо [53-55].

Для контролю вмісту домішок в субстанції та ГЛФ рІІ-7, можливе використання всіх вище перерахованих методів, але згідно літературних даних [9,32,72] доцільніше використання наступних методів: електрофорез в поліакриламідному гелі (визначення домішок із молекулярною масою відмінною від молекулярної маси рІІ-7), ексклюзивна хроматографія (визначення димерів, олігомерів та агрегованих форм), обернено-фазова рідинна хроматографія (чистота). Методи електрофоретичного аналізу та ексклюзивної хроматографії ми уже описували раніше, тож зупинимось більш детально на використанні методу обернено-фазової рідинної хроматографії (ДФУ 2.0, 2.2.29) для контролю чистоти. Для проведення цього аналізу використовують систему вискоєфективної рідинної хроматографії з аналітичною колонкою заповненою октадецилсилільним силікагелем з розміром частинок 5 мкм та розміром пор 30 нм, довжина колонки 150 мм, діаметр – 3,9 мм. Спочатку на колонку наносять пробу білка в 50 мМ ацетатному буфері з додаванням L-аргініну та твіну-80, після чого проводять процедуру елюювання білка з колонки лінійним градієнтом від 90% мобільної фази А (0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в воді) до 70% мобільної фази Б (0,1 % трифтороцтової кислоти, 99,9% ацетонітрилу). Розділення проводять при кімнатній температурі, швидкість потоку 1 мл/хв протягом 30 хвилин, детекція при довжині хвилі 210 нм. Хроматограму аналізують та визначають площу усіх піків та суму площ усіх піків крім основного. Сума площ усіх піків, крім основного не повинна перевищувати 5,0 % суми площ усіх піків.

*Ступінь активності* є важливою характеристикою рекомбінантних продуктів. Відповідні валідовані методи вимірювання ступеня активності повинні бути складовою специфікації якості. Для оцінки активності рекомбінантного білка можливо використовувати різні методи аналізу (біохімічні, імунохімічні, біологічні тощо), вибір яких обумовлюється специфікою самого білка [51, 73-77]. Метод оцінки ступеня активності рІІ-7

було розглянуто вище під час описання ідентифікаційних методів. Оцінку ступеня активності доцільно вносити до специфікацій як на АФІ, так і на ГЛФ.

*Кількісний вміст активної речовини*, зазвичай базується на визначенні вмісту протеїну (маси), має бути визначений за допомогою відповідного методу. Для кількісного визначення можна застосовувати спектрофотометричний метод (ДФУ 2.0, 2.2.25) або вискоефективну рідинну хроматографію (ДФУ 2.0, 2.2.29) [53-55, 73-77]. Оцінка кількісного вмісту доцільна як при проведенні контролю якості АФІ, так і при контролі ГЛФ. Методи рідинної хроматографії було розглянуто раніше, тому розглянемо спектрофотометричні методи з точки зору їх можливості застосування для контролю кількісного вмісту рІЛ-7. Можливо провести пряме спектрофотометричне вимірювання розчину рІЛ-7 використовуючи як компенсаційний розчин буферний розчин, що входить до складу АФІ чи ГЛФ. При вимірюванні враховують коефіцієнт молекулярної екстинції, що для рІЛ-7 складає – 2,43 оптичні одиниці при довжині хвилі 280 нм, що відповідають 1 мг білка в 1 мл розчину [32].

Також можливе використання непрямих колориметричних методів вимірювання: метод Лоурі, метод Бредфорда (Кумасі), метод біцінхонінічної кислоти (БХК), біуретовий метод або метод дериватизації білка. Ці методи більш точніші ніж метод прямого спектрофотометричного вимірювання та дозволяють уникнути впливу заважаючих речовин, які також поглинають ультрафіолетове випромінювання за довжини хвиль 280 нм[78].

*Інші показники якості*. При розробці специфікації якості на АФІ та ГЛФ на основі рекомбінантного білка застосовують й типові фармакопейні випробування, зокрема: стерильність (ДФУ 2.0, 2.6.1) або мікробіологічна чистота (ДФУ 2.0, 2.6.12 та ДФУ 2.0, 2.6.13), бактеріальні ендотоксини (ДФУ 2.0, 2.6.14), аномальна токсичність (ДФУ 2.0, 2.6.9), рН (ДФУ 2.0, 2.2.3), та випробування, що використовують для ГЛФ, в залежності від обраної лікарської форми: об'єм вмісту контейнера (ДФУ 2.0, 2.9.17), механічні включення (ДФУ 2.0, 2.9.19, та ДФУ 2.0, 2.9.20, та ДФУ 2.0, 2.9.21),



однорідність дозованих одиниць (ДФУ 2.0, 2.9.5, та ДФУ 2.0, 2.9.6) та вміст води для ліофілізованих лікарських препаратів (ДФУ 2.0, 2.2.32) тощо.

### **Висновки до розділу 1.**

Інтерлейкін-7 є потужним проліферативним цитокіном для стимуляції адаптивної імунної реакції, який можна використовувати в комплексній терапії солідних пухлин, хронічних вірусних та бактерійних інфекцій і при трансплантаційних процедурах, тому розробка біотехнології отримання препаратів рекомбінантного ІЛ-7 людини є актуальним завданням. Потенційні напрямки застосування препаратів, створених на основі рІЛ-7, вимагають великомасштабних кількостей очищеного рекомбінантного білка. Хоча в даний час створено і описано багато систем експресії, які можуть бути використані як продуценти рІЛ-7. В даний час багато рекомбінантних протеїнів отримують в прокариотических системах експресії з використанням клітин продуцентів *E. coli*. Для синтезу рІЛ-7 оптимальним варіантом є створення системи експресії на основі продуцента *E. coli* BL21 (DE3) і плазмідної вектора, яка продукує високі виходи цільового білка. Індукція синтезу інтерлейкіну-7 в наведеному продуцента може проводитися за допомогою ферментації на середовищі для аутоіндукції, що дає можливість високих виходів цільового білка. Основним недоліком використання *E. coli* є утворення тілець включення, що потребує рефолдингу білка після його біосинтезу. Крім того, існує ризик забруднення отриманого препарату компонентами клітини і генетичним матеріалом *E. coli*. Цю проблему досить просто усунути за допомогою постадійний процедури очищення на катіонообмінних і аніонообмінних сорбентах.

Стандартизація АФІ та ГЛФ на основі рекомбінантних білків потребує індивідуального підходу з врахуванням властивостей конкретної речовини. Для аналітичної стандартизації АФІ та ГЛФ на основі рІЛ-7 доцільно використовувати такі методики, що підтверджуватимуть якість та безпечність отримуваних продуктів: електрофорез в поліакриламідному гелі, ексклюзивна

хроматографія, спектрофотометричні методи, специфічна активність, обернено-фазова рідинна хроматографія, імуноферментний аналіз для визначення залишкової ДНК та білків клітини хазяїна. Також доцільним є використання ряду загальних методик для визначення таких показників як рН, стерильність, аномальна токсичність та бактеріальні ендотоксини. До перспективних лікарських форм готових препаратів рІЛ-7 слід віднести: ін'єкційні лікарські форми у вигляді ліофілізованого порошку, лікарські форми інтраназального введення та інгаляцій, для вагінального та ректального введення (супозиторії) та лікарські форми для зовнішнього застосування. Враховуючи високий терапевтичний потенціал цього цитокіну, важливим напрямом подальших розробок є створення різноманітних фармацевтичних форм на основі рІЛ-7, що забезпечуватимуть доставку рІЛ-7 та збереження його стабільності та біологічної активності.

**Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Отримання рекомбінантних білків та їх використання у серодіагностиці / Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Широбоков, А.А. Григоренко, О.М. Дуган, Т.М. Луценко, А.Г. Комар; Під ред. В.П. Широбокова. – К.: НТУУ «КПІ», 2015. – С. 112-145.
2. Луценко Т.Н., Галкин А.Ю. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химия, технология органических веществ и биотехнология». – 2015. – № 4 (177). – С. 188–197. (Білорусь).

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали

#### 2.1.1. Культури клітин

У роботі використовували перещеплювану суспензійну культуру клітин Jurkat людського походження від хворого Т-лімфобластоїдною лейкемією (Інститут імунології РАМН, Росія), яка культивується в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> у середовищі RPMI-1640, «Sigma», США, з 2 мМ глютаміну і прогрітою 10 % ембріональною телячою сироваткою (при температурі 37 °C). Густина клітин становила  $(3-9) \times 10^5$  клітин/мл.

Також використовували перещеплювану лінію клітинної культури невринома Гассерова вузла щура (НГВЩ), одержану в НДІ морфології людини РАМН, Росія (живильне середовище складалось із 88 % середовища RPMI-1640, «Sigma», США, з додаванням 12 % інактивованої прогріванням ембріональною телячою сироваткою, «Панеко», Росія) і антибіотиків, та перещеплювану лінію клітинної культури МДВК (нирка бика), отриману з Інституту вірусології РАМН, м.Москва, Росія, живильне середовищі RPMI-1640 («Sigma», США) та 10 % інактивованої прогріванням ембріональною телячою сироваткою («Панеко», Росія,) і антибіотиків. Культивування проводили в темостаті з 5% CO<sub>2</sub> та температурі 37°C. Також у роботі використовували перещеплювану культуру клітин нирки собак (Madin-Darby canine kidney, MDCK), та перещеплювану культуру клітин нирки африканської зеленої мавпи Vero (Інститут вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН, Росія), які культивували в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> у середовищі RPMI-1640, «Sigma», США, з 10 % ембріональною телячою сироваткою (при температурі 37 °C) та додаванням гентаміцину [79].

Також в роботі використовували моноклеарні клітини отримані з периферичної донорської крові людей.

### 2.1.2. Віруси

Як сурогатний ВГС використовували вірус бичачої вірусної діареї (ББВД), що є тест-моделлю вірусу гепатиту С. Вірус бичачої вірусної діареї відноситься до роду Pestivirus в межах родини Flaviviridae. Генوم ББВД складається із одного позитивного ланцюга РНК. Інфекційний титр вірусу після десяти проведених пасажів в культурі клітин MDBK складав 6-7 lg ID<sub>50</sub>.

При проведенні роботи використано штам вірусу грипу А/М/1/47(Н1N1) одержаний з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН, Росія. Інфекційний титр алантоїсної культури становив 7,0 lg EID<sub>50</sub>/0,2 мл, титр гемаглютиніну – 1:512 гемаглютинуючих одиниць (ГАО) на 0,2 мл.

У роботі використовували вірус простого герпесу 2 типу (ВПГ-2), а саме штам ВН, одержаний з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського РАМН, Росія. Вірус підтримували серійними пасажами в культурі клітин Vero. Інфекційний титр за цитопатичною дією (ЦПД) в культурі клітин складав 7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл. До початку експериментальних досліджень вірус зберігали при мінус 70 °С.

### 2.1.3. Середовища та реактиви

Під час досліджень використовували наступні середовища та реактиви:

- середовище RPMI-1640, «Sigma», США;
- LB Agar (GE Healthcare, США);
- Bacto™ Proteose Peptone (Becton, Dickinson and Co. Sparks, Франція);
- Yeast Extract (Helicon, Росія);
- MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (AppliChem, Німеччина);
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma, США);
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (ROTH, Німеччина);
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (AppliChem, Німеччина);
- лактоза (Sigma, США);

- гліцерол (Sigma, США);
- глюкоза (AppliChem, Німеччина);
- $\text{NaHCO}_3$  (Макрохим, Росія);
- хлорамфенікол (USB, США)
- Д-мальтоза (Макрохим, Росія);
- $\text{HCl}$  (Макрохим, Україна);
- ембріональна теляча сироватка («Sigma», США);
- вода деіонізована для культур клітин.

#### **2.1.4. Обладнання**

Для роботи використовували наступне основне обладнання: ламінарний бокс Hera Safe,  $\text{CO}_2$ -інкубатор, деіонізатор, набір для стерилізації культуральних середовищ, спектрофотометр, холодильники на  $4^\circ\text{C}$ , мінус  $20^\circ\text{C}$  і мінус  $70^\circ\text{C}$ , інвертований мікроскоп «Биолам П-1», посудини Дюара з рідким азотом для зберігання клітин, рідинний хроматоргаф низького тиску Biologic LP з колектором фракцій, термостат ТС-80М, камера для вертикального електрофорезу, «BioRad», центрифуга 5804 з набором роторів, дозатори одна та восьмиканальні різного об'єму.

#### **2.2. Основні методи досліджень**

Загальна методика досліджень базувалася на використанні клітинно-інженерних, імунологічних, біохімічних, фізико-хімічних та математичних методів.

Під час проведення досліджень автор керувався принципами «Етичного кодексу ученого України» та Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

##### **2.2.1. Технологія одержання субстанції rIL-7 (мікробіологічні та молекулярно-біологічні методи)**

Основним матеріалом досліджень був рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА», м. Київ). Рекомбінантний ІЛ-7 був

отриманий за допомогою технології рекомбінантних ДНК в системі експресії на основі продуцента *E. coli BL21(DE3)* та плазмідного вектора pACYC184 (патент України на винахід № 112442 «Спосіб отримання інтерлейкіну-7 людини за допомогою рекомбінантної молекули, рекомбінантна молекула, що містить кДНКову копію структурної частини сплайсованого кДНК гена інтерлейкіну-7 людини та експресійного вектору ДНК»).

Синтез білка отримували за допомогою ферментації продуцента на середовищі для аутоіндукції наступного складу: пептон, дріжджовий екстракт,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , лактозу, гліцерол, глюкозу, D-мальтозу,  $\text{NaHCO}_3$  та хлорамфенікол при температурі  $38^\circ\text{C}$  при орбітальному качанні з швидкістю 160 об/хв 14-18 годин, що дало змогу отримати високі виходи цільового білка. По завершенню інкубації клітини осаджували центрифугуванням при 4000 об/хв. протягом 15 хв [36].

В результаті отримували цільовий білок у вигляді внутрішньоклітинних агрегантів, так званих тілець-включень. Для подальшої очистки отриманого рІЛ-7 клітини руйнували за допомогою біохімічного методу. Для етапу виділення і очищення ТВ використовували послідовну відмивку в буферних розчинах наступного складу:

Буфер А: 50mM TRIS-HCl, pH 8,0, 5mM ЕДТА, 100mM NaCl, 1мг/мл лізоцим (лізоцим додається в розчин безпосередньо перед використанням);

Буфер В: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,0, 1mM ЕДТА, 0,1% Triton X-100;

Буфер С: 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 0,14M NaCl;

Буфер D: 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 0,3% дезоксихолат Na.

Клітини ресуспендували в буфері А в об'ємному співвідношенні буфер/вихідна культура 1:5. Інкубували на льоду 30 хв (до появи в'язкості в розчині). Потім додавали  $\text{MgSO}_4$  до кінцевої концентрації 20 мм і ДНКазу до кінцевої концентрації 1 мг/л, добре розмішували і інкубували при кімнатній температурі близько 20 хв до повного зникнення в'язкості лізату. Після цього об'єм лізату доводили буфером Б до об'єму вихідної культури, добре розмішували і інкубували протягом 12 годин при  $4^\circ\text{C}$ . Після інкубації лізат

розмішували і розливали в пробірки і центрифугували 15 хв при 13 тис.об./хв ( $15,7 \times 10^3 g$ ). Надосад зливали. До осаду в кожній пробірці додавали буфер С і ресуспендували в ньому осад за допомогою ультразвукового дезінтегратора. Після ресуспендування об'єм отриманих суспензій доводили до об'єму вихідної культури і інкубували протягом 1 години. Далі матеріал осаджували в тих же умовах і послідовно проводили всі маніпуляції з буфером D і деіонізованою водою (у випадку з водою, інкубація протягом години не потрібно) [38,39].

Розчинення ТВ проводили в буферному розчині з додаванням хаотропних агентів наступного складу: 7М гуанідин гідрохлорид, 100мМ Тріс-НСl, 0,1% Твін-20 та 50мМ дітіотріетол. Розчинення проводили виходячи зі співвідношення: на 1,2-1,5 мг інтерлейкіну-7 – 2 мл буферного розчину (вміст білка в отриманій партії ТВ визначається до солюбілізації шляхом денситометрирування ДСН-ПААГ). У такому складі ТВ ресуспендували і інкубували при 22°C протягом 1-1,5 години на мішалці (2 об/хв). По завершенню інкубації отриманий розчин центрифугували при 13,2 тис. об./хв, упродовж 15 хв.

Отриманий супернатант використовували для подальшої ренатурації цільового білка. Отриманий після солюбілізації ТВ супернатант наносили на колонку XK26/40 (GE Healthcare), заповнену Sephadex G-25 fine. Сорбент попередньо врівноважували 5 об'ємами розчину Кларка-Лабса (50 мл 0,1м  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3,6 г/л) + 13,9 мл 0,1м NaOH, pH 6,0), що містить 0,1 М L-аргінін гідрохлориду та 0,1% Tween-80.

На колонку наносили 2 мл супернатанта попереднього етапу солюбілізації, що містить 1,2-1,5 мг цільового білка. Об'єм елюату варіював в діапазоні від 4,5 до 5,1 мл. Отриманий елюат центрифугували при 13,2 тис.об./хв протягом 15 хв, осад видаляли. Після центрифугування супернатант з центрифужних пробірок об'єднувався і передавався для подальшого очищення. Очищення рекомбінантного ІЛ-7 проводили у дві стадії з використанням ДЕАЕ сефарози (слабкий аніонообмінник) - перша стадія, і SP сефарози (сильний катіонообмінник) - друга стадія.

На першій стадії для проведення очистки рекомбінантного ІЛ-7 в колонку упаковували 5 мл ДЕАЕ сефарози («Sigma»), під'єднували до автоматизованої хроматографічної системи FPLC («Pharmacia») і послідовно промивали наступними розчинами:

1. 5 об'ємами колонки (25 мл) деіонізованої води;
2. 5 об'ємами колонки (25 мл) буфера  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 0,1 М L-аргініну, 0,1% Твін-80, 1 М NaCl;
3. потім колонку врівноважували пропусканням через неї 5-10 об'ємами колонки (25-50 мл) буфера  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 0,1 М L-аргініну, 0,1% Твін-80.

Після промивання і врівноваження, на колонку наносили ренатурірований рекомбінантний ІЛ-7, попередньо профільтрований через 0,45 мкм PVDF мембранний фільтр («Millipore»). Для збереження дисульфідних зв'язків у ренатурірованню суміш додавали окислювально-відновну пару глутатіону (окислений/відновлений) до кінцевої концентрації в розчині 1 мМ, інкубували 30 хв при +4°C.

Розчини, які використовували для хроматографічного очищення рІЛ-7, фільтрували через 0,22 мкм мембранний фільтр («Millipore») і дегазували з використанням вакуумного насосу.

Фракцію рекомбінантного ІЛ-7, яку пропускали через ДЕАЕ сефарозу використовували для подальшого очищення на SP сефарозі.

Для проведення другої стадії очистки в колонку упаковували 5 мл SP сефарози GE Healthcare, під'єднували до автоматизованої хроматографічної FPLC системі (Pharmacia) і промивали наступними розчинами, склад яких наведено на попередній сторінці.

Після промивань і врівноваження колонки на неї наносили фракцію рекомбінантного ІЛ-7, яка перед цим (перша стадія) була пропущена через ДЕАЕ-сефарозу.

Елюцію рекомбінантного ІЛ-7 проводили ступінчастим градієнтом NaCl:

1.  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Твін-80 0,1 М NaCl.



2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0 , 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Твін-80 0,2 М NaCl.
3.  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Твін-80 0,3 М NaCl,
4.  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Твін-80 0,4 М NaCl.
5.  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 0,7 М L-аргініну, 0,1 % Твін-80 0,4 М NaCl.
6.  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 2,0 М L-аргініну, 0,1 % Твін-80 0,4 М NaCl.

Всі фракції отримані в результаті хроматографічного очищення рекомбінантного ІЛ-7 збирали і аналізували в 12% поліакриламідному гелі і з використанням спектрофотометра NanoDrop.

У подальшу роботу відбиралася основна частина піку, а його плечі відкидалися.

Підготовку сорбенту і розчинів для хроматографії проводили, як описано для ДЕАЕ-сефарози. Швидкість нанесення білка на колонку становила 0,5 мл/хв, швидкість при промиванні і зрівноважуванні колонки становила 1,0 мл/хв.

### **2.2.2. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на різних моделях in vitro (вірусологічні та імунологічні методи)**

#### **2.2.2.1. Дослідження протівірусної активності рІЛ-7 на різних моделях експериментальної вірусної інфекції (вірусологічні методи).**

*Визначення проліферативної активності клітин.* Проліферацію клітин *Jurkat*, оброблених препаратом рІЛ-7 і заражених ВГС проводили в камері Горяєва за формулою:

$$X = A \times 400 \times C / B,$$

де X – шукана кількість клітин в 1 мм<sup>3</sup>; A – сума клітин, підрахованих в певному об'ємі камери; B – кількість підрахованих малих квадратів; C – розведення клітин [80].

*Модель культури – продуцента клітин, трансфєкованих кДНК вірусу гепатиту С.* Експерименти проводили на лінії клітин *Jurkat*. Джерелом ВГС слугували нерозведена плазма крові хворих на гепатит С з різним вірусним навантаженням, яка містить РНК ВГС. Останню виділяли з використанням

комплекту реагентів «РИБО-сорб» (ФДУН «ЦНДІЕ» Роспоживнагляду, Росія). кДНК ВГС отримували реакцією зворотної транскрипції РНК з використанням комплекту реагентів «Реверта-Л» (ФДУН «ЦНДІЕ» Роспоживнагляду, Росія). До 10 мкл готової реакційної суміші (ліофілізований ДДТ, 125 мкл розчину RT-mix і 6 мкл ревертази MMLv – зворотна транскриптаза вірусу лейкемії мишей) додавали 10 мкл РНК-проби і проводили транскрипцію за температури 37 °С протягом 30 хв, в результаті чого отримували кДНК. Суспензійні культури клітин *Jurkat* трансфекували за допомогою реагенту *Turbofect*.

*Трансфекція.* Трансфекцію проводили за стандартним протоколом [79] за допомогою трансфекційного реагенту *Turbofect* (Thermo Scientific Products). Щільність клітин в день трансформації становила  $5 \times 10^4$  (для перещеплюваних клітин) і  $5 \times 10^5$  (суспензійних клітин) в 1 мл поживного середовища. 1 мкг ДНК розводили в 100 мкл без сироваткового середовища RPMI-1640, потрушуючи розчин додавали 2 мкл трансфекуючого реагенту. Після пікетування або струшування на центрифугі-вортексі, інкубували 15-20 хв. при кімнатній температурі. 100 мкл трансфекуючого реагенту з ДНК краплями додавали в кожен лунку з культурою клітин. Інкубували культури при 37 °С в термостаті з CO<sub>2</sub>. Культури трансфегованих кДНК ВГС інкубували при температурі 36,6 °С в термостаті з подачею 5 % CO<sub>2</sub>. Тестування вірусу проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на 2-му пасажі на 9-у добу культивування і на 5-му пасажі на 17-у добу культивування. Всі трансфеговані культури продукували вірус гепатиту С як на 9-у та 17-у добу культивування культури *Jurkat* кДНК.

*Противірусна активність препарату рІЛ-7.* Для вивчення антивірусної активності препарату рІЛ-7 його в різних концентраціях вводили в культуру клітин *Jurkat*, яка продукує ВГС. Через 5 діб визначали вірусне навантаження у кожній пробі методом ПЛР. На моделі сурогатного вірусу гепатиту С антивірусну активність вивчали в культурі МДВК, яку обробляли різними розведеннями препарату ІЛ-7 і додавали вірус в дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>, культури інкубували в термостаті до специфічної цитопатогенної дії в контролі вірусу, а

потім в культуральному середовищі різних розведень препарату визначали інфекційний титр вірусу.

*Цитологічний аналіз.* Цитологічний аналіз впливу ІЛ-7 проводили в клітинах НГВЦ після фіксації клітин, які вирощували на покривних скельцях, в рідині Шабдаша (9 частин азотнокислої міді в етиловому спирті та 1 частина нейтрального формаліну) упродовж 30 хв. Фарбування проводили гематоксилін-еозином за загальноприйнятою методикою. Мітотичний індекс визначали шляхом обчислення 3000-10000 клітин і виражали у проміле (‰) (кількість мітозів на 1000 клітин). Одночасно визначали наявність патологічних форм мітозів [81].

#### **2.2.2.2. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на мононуклеарних клітин периферичної крові (імунологічні методи).**

*Отримання мононуклеарних клітин периферичної крові (МНПК) та стимуляція ФГА.* Отримували кров від перевірених донорів з такими антикоагулянтами як гепарин (використовувати 10 од/мл крові) або ЕДТА. Обсяг крові складав 14 мл. За допомогою градієнта щільності Histopaque 1077 (Sigma) проводили розділення крові на центрифuzі з баккет-ротором (Liston 2204 Classic) протягом 30 хв при 1500 об/хв при кімнатній температурі. Збирали МНПК за допомогою стерильної піпетки та проводять двократну відмивку клітин в 10 мл середовища для відмивки (RPMI-1640 (Biowest), з 2% вмістом фетальної телячої сироватки за допомогою центрифугування протягом 10 хв при 400 g (1000об/хв) при кімнатній температурі. Клітини ресуспендували в 4 мл середовища для культивування клітин (RPMI з 10% фетальної телячої сироватки, 10 мкг/мл ФГА (РНА Sigma L 8754) та 50 мМ меркаптоетанолу). Проводили підрахунок кількості життєздатних клітин після фарбування 0,4% трипановим синім в камері Горяєва. Доводили клітини до концентрації  $(1-4) \times 10^6$  клітин/мл в середовищі для культивування та культивували в матрацах Т45 (10 мл/матрац) протягом 5 діб при 37°C в інкубаторі з 5% вмістом CO<sub>2</sub>. Після стимуляції ФГА суспензію клітин центрифугували при 1000 об/хв протягом 10 хвилин. Проводили ще один етап відмивки як було описано

раніше. Клітини ресуспендували в 3 - 5 мл середовища для культивування, підраховували кількість життєздатних клітин після фарбування 0,4% трипановим синім в камері Горяєва. Доводили кількість клітин до  $2 \times 10^6$  клітин/мл. Клітини розсівали в планшети на 96 лунок по 50 мкл на лунку.

*Проведення контролю біологічної активності.*

Приготування розчинів стандарту: В якості стандарту використовували рІЛ-7 фірми «РергоТесч», готують розведення в фосфатному буфері рН 7,4 з додаванням 0,1% телячого сироваткового альбуміну до концентрації 1 нг/мкл - розчин № 1. З розчину №1 готували розведення: 0,125 нг, 0,25 нг, 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 6 нг в мл в середовищі для культивування МНПК.

Приготування розчинів зразку: З отриманих зразків готували розведення в фосфатному буфері рН 7,4 з додаванням 0,1% телячого сироваткового альбуміну до концентрації рІЛ-7 - 1 нг/мкл (розчин №1). З розчину №1 готували розведення 0,25 нг, 0,5 нг, 2 нг, 5 нг, 10 нг, 20 нг, 30 нг, 40 нг, 50 нг в мл в середовищі для культивування МНПК.

Отримані розведення стандарту та зразка вносили в лунки планшету з МНПК об'ємі 50 мкл у трьох повторах і інкубували планшети 4 доби при 37°C в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>. Після цього вносили по 15 мкл розчину МТТ (5 мг/мл) у кожен лунку і інкубують протягом 4 годин при 37° в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>. Після чого для розчинення кристалів формагану додавали по 200 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) в кожен лунку. Вимірювали оптичну щільність на рідері при 570 нм. Будувади графіки. ОГ проти логарифма концентрації ІЛ-7. Графік мав являти собою сигмоїдальну криву. ED<sub>50</sub> (ефективна доза) обчислювали з лінійної частини графіка і представляє 50% проліферативний відповідь щодо максимального проліферативної відповіді, отриманого в лінійній частині графіка. Для обчислення ED<sub>50</sub> проводили апроксимацію отриманих даних сигмоїдною кривою за допомогою статистичних пакетів.

### 2.2.3. Валідація методики визначення біологічної активності рІЛ-7 (математичні методи)

Оптимізований метод проведення контролю біологічної активності було перевірено відповідно до процедур, описаних в ІСН керівних принципах Q2 (R1) [13], а також програмного комплексу Microsoft Excel. Було розглянуто наступні параметри валідації: специфічність, лінійність і діапазон застосування, правильність, прецизійність та робустність [82-85].

Всі розрахунки проводили в «нормалізованих» координатах, що дозволяє сформулювати єдині критерії, пов'язані тільки з допусками вмісту. Але незалежними від специфіки конкретних величин. Нормалізовані координати визначалися наступним чином:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\% \quad (1)$$

$$Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%, \quad (2)$$

де  $C_i$  – концентрація аналізованої речовини в  $i$ -му розчині (або зразку),  $C_{st}$  – концентрація цієї ж речовини в розчині порівняння.  $A_i$  – аналітичний сигнал речовини, що аналізують для  $i$ -ого аналізованого розчину,  $A_{st}$  – аналітичний сигнал цієї ж речовини для розчину порівняння.

В подальшому всі розрахунки та критерії приводять для нормалізованих величин  $X_i$  та  $Y_i$ .

Лінійну залежність розраховували методом найменших квадратів

$$(A_i/A_{st}) 100 = b (C_i/C_{st}) 100 + a,$$

$$Y_i = b X_i + a, \quad (3)$$

де  $a$  – вільний член для розрахованої регресійної прямої (відрізок, що відсікається на осі ординат);  $b$  – кут нахилу для розрахованої регресійної прямої.

Концентрації, які досліджуються при вивченні лінійності, характеризуються стандартним відхиленням

$RSD_y$  (%), яке розраховують за формулою:

$$RSD_y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C)^2}{C^2 \times (g-1)}} \times 100\%, \quad (4)$$

де  $C_i$  – концентрація  $i$ -того розчину,  $C$  – середня концентрація розчинів,  $g$  – обсяг вибірки (число точок прямої) [83].

*Оцінка специфічності аналізу.* Визначення специфічності методу контролю біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини проводили на МНПК людини в порівнянні з контролем біологічної активності інтерлейкіну-7 людини рекомбінантного стандартного зразка (Peprotech, Cat.N. 200-07). RSD не має перевищувати 2%.

*Оцінка діапазону застосування (ДЗ) та лінійності.* Для вивчення даних валідаційних характеристик використовували отриманий рІЛ-7 в наступних розведеннях: 0,125 нг, 0,25 нг, 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 6 нг в мл в середовищі для культивування МНПК. Контроль кожного розведення проводили в трьох повторах.

*Оцінка правильності та прецизійності.* Оскільки методика визначення біологічної активності є кількісною, тому проводили визначення в аналізі 9 розведень, концентрації яких рівномірно розподілені в досліджуваних межах застосування даної методики: 0,125 нг, 0,25 нг, 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 6 нг в мл. Контроль кожного розведення проводять в трьох повторах. Відсоток RSD було встановлено, менш ніж 2,0%. Для оцінки прецизійності було проведено даний аналіз паралельно на МНПК отриманих від двох різних донорів.

#### 2.2.4. Фармакопейні мікробіологічні методи

*Живильні середовища.* При проведенні випробувань використовували живильні середовища (ЖС) відповідно до вимог ДФУ 2.0 (2.6.12, 2.6.13). ЖС готували з сухих живильних середовищ або окремих інгредієнтів, кожна партія готового середовища проходила контроль стерильності, ростових та при необхідності інгібіторних та індикативних властивостей. Перелік, характеристика і результати контролю придатності середовищ наведені у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

**Живильні середовища, використані для перевірки придатності методики**

Назва середовища	Призначення
Соєво-казеїновий бульйон	Підготовка тест-штамів бактерій, середовище збагачення для проведення випробування на наявність <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Соєво-казеїновий агар	Визначення ТАМС <sup>1</sup>
Сабуρο-декстрозний агар	Підготовка тест-штамів грибів
Сабуро-декстрозний агар, який містить антибіотик	Визначення ТУМС <sup>2</sup>
Манітно-сольовий агар	Диференційно-діагностичне середовище для виділення <i>Staphylococcus aureus</i>
Цитримідний агар	Диференційно-діагностичне середовище для виділення <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Примітки:

<sup>1</sup>ТАМС (total aerobic microbial count) – загальне число аеробних мікроорганізмів.

<sup>2</sup>ТУМС (total yeast/mold count) – загальне число дріжджових і пліснявих грибів.

*Тест-мікроорганізми.* При проведенні випробувань використовували тест-мікроорганізми відповідно до вимог ДФУ 2.0 (2.6.12, 2.6.13).

Перелік тест-мікроорганізмів наведений в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

**Тест-мікроорганізми, використані для перевірки придатності методики**

Назва тест-мікроорганізму	Номер штаму	Призначення
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Перевірка придатності методики визначення ТАМС

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Перевірка придатності методики визначення ТАМС, перевірка придатності методики випробування на окремі види мікроорганізмів
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Перевірка придатності методики визначення ТАМС, перевірка придатності методики випробування на окремі види мікроорганізмів
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Перевірка придатності методики визначення ТАМС та ТУМС
<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i>	ATCC 16404	Перевірка придатності методики визначення ТАМС та ТУМС

Зберігання тест-мікроорганізмів здійснювалося відповідно до “Порядку одержання, обліку, зберігання та утримання тест-штамів мікроорганізмів для проведення контролю якості лікарських засобів за мікробіологічними показниками”.

Для проведення випробувань як інокулят використовували суспензії тест-мікроорганізмів, які готували, як наведено нижче. Тест-мікроорганізми вирощували, кожний окремо, на відповідному живильному середовищі. Тест-штами бактерій вирощували на соєво-казеїновому бульйоні при температурі від 30 °C до 35 °C від 18 до 24 годин. Тест-штами грибів вирощували на поверхні Сабуро-декстрозного агару при температурі від 20 °C до 25 °C. Тест-мікроорганізм *Candida albicans* вирощували протягом 2 діб, тест-мікроорганізм *Aspergillus brasiliensis (niger)* – протягом 5-7 діб до отримання добре розвинених спор.

Для приготування вихідних суспензій тест-штамів бактерій бульйонні культури розводили буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0



до отримання суспензії, яка містила від  $10^3$  КУО/мл до  $10^4$  КУО/мл тест-мікроорганізму.

Для приготування вихідної суспензії тест-мікроорганізму *C. albicans* культуру змивали з поверхні Сабуро-декстрозного агару за допомогою буферного розчину з натрію хлоридом та пептоном рН 7,0 та розводили тим же розчинником до отримання суспензії, яка містила від  $10^3$  КУО/мл до  $10^4$  КУО/мл тест-мікроорганізму.

Для приготування вихідної суспензії тест-мікроорганізму *A. brasiliensis* (*niger*) культуру змивали з поверхні Сабуро-декстрозного агару за допомогою буферного розчину з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0, який містив 0,05 % полісорбату-80, та розводили за допомогою буферного розчину з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 до отримання суспензії, яка містила від  $10^3$  КУО/мл до  $10^4$  КУО/мл тест-мікроорганізму.

*Перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів.* Методика випробування на загальне число життєздатних мікроорганізмів відповідає вимогам ДФУ 2.0 (2.6.12).

Підготовка зразків: 10 мл препарату поміщають в стерильну мірну посудину, доводять об'єм до 100 мл стерильним буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 та ретельно перемішують (зразок А); 10 мл препарату поміщають в стерильну мірну посудину, доводять об'єм до 200 мл стерильним буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 та ретельно перемішують (зразок Б).

Для визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС) по 1 мл підготовленого зразка Б висівають двошаровим методом на кожну з двох чашок Петрі з соєво-казеїновим агаром. Для визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) по 1 мл підготовленого зразка А висівають двошаровим методом на кожну з двох чашок Петрі з Сабуро-декстрозним агаром, який містить антибіотик.

Підготовка інокуляту. Для кожного з тест-мікроорганізмів *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans*

ATCC 10231 та *A. brasiliensis (niger)* ATCC 16404 готували вихідну суспензію монокультури, що містила від  $10^3$  КУО/мл до  $10^4$  КУО/мл, як зазначено в розділі «Матеріали та методи». Суспензію використовували як інокулят при проведенні перевірки придатності методики визначення ТАМС і ТУМС.

Перевірка придатності методики. Зразки готували, як зазначено в методиці, що наведена вище, використовуючи стерильний розчинник. Від підготовленого зразка Б відбирали 5 окремих порцій по 10 мл кожна. Кожну порцію інокулювали монокультурою одного з тест-мікроорганізмів *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. brasiliensis (niger)*, для чого до 10 мл зразка додавали 0,1 мл інокуляту (який містив від  $10^3$  КУО/мл до  $10^4$  КУО/мл).

В контрольному досліді 0,1 мл інокуляту того ж мікроорганізму додавали до 10 мл стерильного розчинника. По 1 мл від кожного інокульованого зразка (дослідного та контрольного) висівали на 2 чашки Петрі як зазначено в методиці. Для висівання зразків використовували соєво-казеїновий агар. Посіви на соєво-казеїновому агарі інкубували при температурі від 30 °C до 35 °C. Інкубацію посівів, які містили тест-штами бактерій, здійснювали протягом 3 діб, посівів, які містили тест-штами грибів – протягом 5 діб. Від підготовленого зразка А відбирали 2 окремі порції по 10 мл кожна. Кожну порцію інокулювали монокультурою одного з тест-мікроорганізмів *C. albicans*, *A. brasiliensis (niger)*, для чого до 10 мл зразка додавали 0,1 мл інокуляту (який містив від  $10^3$  КУО/мл до  $10^4$  КУО/мл). В контрольному досліді 0,1 мл інокуляту того ж мікроорганізму додавали до 10 мл стерильного розчинника. По 1 мл від кожного інокульованого зразка (дослідного та контрольного) висівали на 2 чашки Петрі як зазначено в методиці. Для висівання зразків використовували Сабуро-декстрозний агар, який містить антибіотик. Посіви на Сабуро-декстрозному агарі інкубували при температурі від 20 °C до 25 °C протягом 5 діб.

Для отримання статистично вірогідних результатів випробування проводили для трьох різних серій препарату.

### 2.2.5. Методика оцінки ризиків у технології препарату

За основу методики оцінки ризиків було використано підходи, які сформовано у ДСТУ ISO 14971:2009 «Вироби медичні. Настанови щодо управління ризиком». Для контролю технологічного процесу та якості препарату використовували наступні фармакопейні методики [82].

### 2.2.6. Математичні методи

Обчислення середньоквадратичного відхилення. Середньоквадратичне відхилення  $\sigma$  обчислювали за формулою (5):

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{(n-1)}}, d = X_i - X_{\text{ср}}, \quad (5)$$

де  $d$  – різниця між окремими показниками параметру і середньою арифметичною величиною ( $X_i - X_{\text{ср}}$ );  $n$  – кількість досліджуваних зразків;  $X_i$  – значення параметру для окремого зразка;  $X_{\text{ср}}$  – середнє арифметичне параметру всіх досліджуваних зразків [83, 84].

Значення вірогідності отриманих даних обраховували за методикою В.Ю.Урбаха [84] з використанням  $t$ -критерію Ст'юдента та вважали достовірними при рівні значимості  $p < 0,05$ .

### РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ

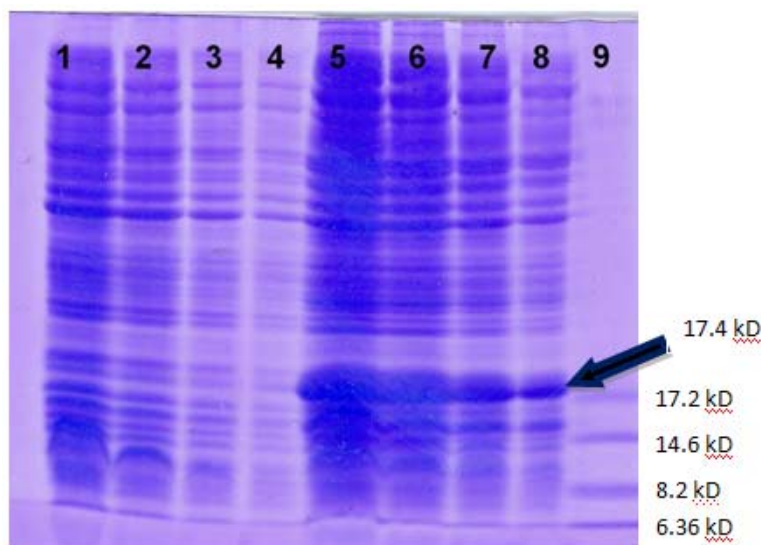
#### 3.1. Оптимізація умов біосинтезу рекомбінантного білка

Джерелом інформаційної РНК для отримання кДНК гену ІЛ-7 був кістковий мозок людини. Poly A+ РНК була виділена з кісткового мозку людини через набір реактивів фірми GE Healthcare (27-9255-01), Великобританія.

Система експресії, що використовується в технології отримання рІЛ-7 сконструйована за допомогою плазмиди pACYC184 (Thermo Scientific, №X06403) та штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) (GE Healthcare, 27-1542-01). Клітини цього штаму мають ген РНК-полімерази фага Т7, який інтегровано у бактеріальну хромосому в складі вектора  $\lambda$ D69. Він може експресуватися під транскрипційним контролем промотора лактозного оперона після індукування ІПТГ або за протоколом аутоіндукції. Індукцію експресії гену рІЛ-7 проводили за протоколом аутоіндукції.

Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продуктів очікуваної молекулярної маси (17,4 кДа), максимальні рівні яких становили 15-20% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli* (рис. 3.1). Вихід цільового білка досягав 0,9 мг/мл вихідної культури *E. coli*.

Описаний рекомбінантний продуцент в подальшому використовували для отримання рІЛ-7 за наступною принциповою технологічною схемою (рис. 3.2).



**Рис. 3.1. Електрофореграма зразків культуральної рідини:**

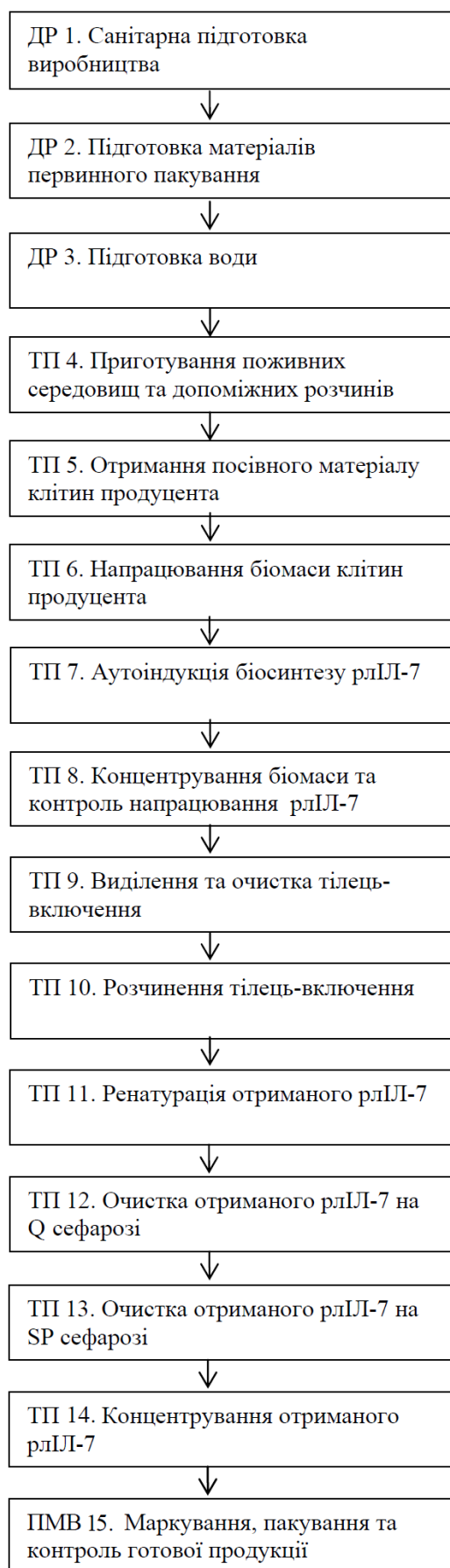
1, 2, 3, 4 – клітини без індукції експресії (40, 20, 10 і 4 мкл, відповідно); 5, 6, 7, 8 – індуковані клітини (40, 20, 10 і 4 мкл відповідно); 9 – маркери ММ

З метою ефективної очистки рлІЛ-7 від білків клітин-продуцентів *E. coli* *BL21 (DE3)* проводили аналіз локалізації в них цільового білка. Аналіз білків клітинних фракцій після індукції експресії показав, що білок рлІЛ-7 накопичувався в нерозчинній фракції бактеріальної цитоплазми – тільцях-включення (ТВ).

Наступним етапом проведеним нами були дослідження, спрямовані на оптимізацію умов культивування продуценту рекомбінантного білка з метою підвищення експресії останнього у клітинах *E. coli*. Серед параметрів оптимізації були визначені наступні:

- температура та тривалість культивування продуценту,
- склад середовища для аутоіндукції,
- швидкість перемішування.

Перш за все, проводили дослідження щодо визначення оптимальної температури культивування з огляду на максимальний вихід цільового продукту. У літературі описано різні температурні режими для культивування прокаріотичних продуцентів рекомбінантних білків, проте можна виділити два базових підходи.

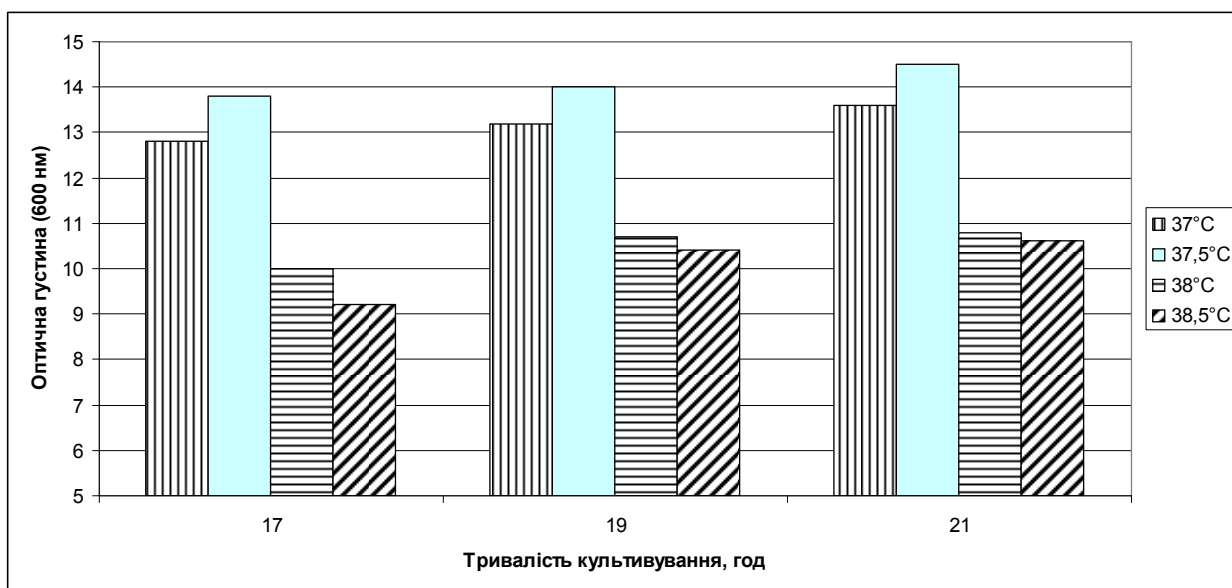


**Рис. 3.2. Принципова технологічна схема отримання субстанції рІЛІ-7**

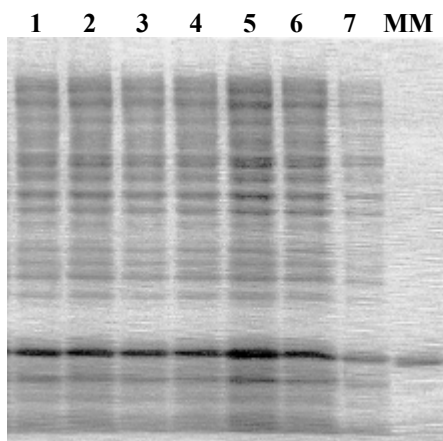
Перший передбачає культивування рекомбінантних бактерій при сталій температурі 36-38°C (як для накопичення біомаси, так і для синтезу цільового продукту) [86], інший – перехід від температури нарощування біомаси (37°C) до більш низької температури для синтезу рекомбінантного протеїну (25-28°C) [87], що забезпечує більш оптимальні умови для укладання поліпептидного ланцюгу рекомбінантного білка та може впливати на ступінь його розчинності, а відтак й на подальшу стратегію виділення та очищення. Другий підхід не є актуальним у випадку індукування синтезу цільового білка за принципом аутоіндукції. Окремим методичним прийомом є так званий термошок (40-43°C) при використанні штаму із термоіндуцибельним рекомбінантним геном [88], який також не був актуальним у нашому випадку.

Дослідження впливу температурного режиму культивування на накопичення цільового білку проводили паралельно із визначенням оптимальної тривалості процесу культивування: проводили серію паралельних дослідів за різних температурних режимів (37, 37,5, 38 та 38,5 °C) та різної тривалості процесу культивування (17, 19 та 21 год). Процес оцінювали за значенням оптичної густини культуральної рідини та концентрації цільового білка, що розраховувалась методом денситометрії (рис. 3.3 та рис. 3.4). При цьому використовували поживне середовище наступного складу: пептон, дріжджовий екстракт,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза,  $\text{NaHCO}_3$  та хлорамфенікол.

Результати досліджень показали, що найбільш ефективним температурним режимом є культивування бактерій при температурі 37,5°C. Визначення найоптимальнішої тривалості процесу аутоіндукції синтезу білка показали найбільша кількість цільового білка накопичується в результаті культивування протягом 21 год, і складали 1,0 мг/л, для 17 год та 19 год – 0,95 мг/мл вихідної культури та 0,98 мг/мл вихідної культури, відповідно. Проте з тривалістю культивування збільшувалася і загальна білків клітини-продуцента і процентний вміст цільового білка від загального вмісту білка складав 18%, 14% та 13%, відповідно, для 17, 19 та 21 год культивування (рис. 3.5).



**Рис. 3.3. Визначення оптимальних температурних параметрів культивування штаму-продуцента рекомбінантного білка**



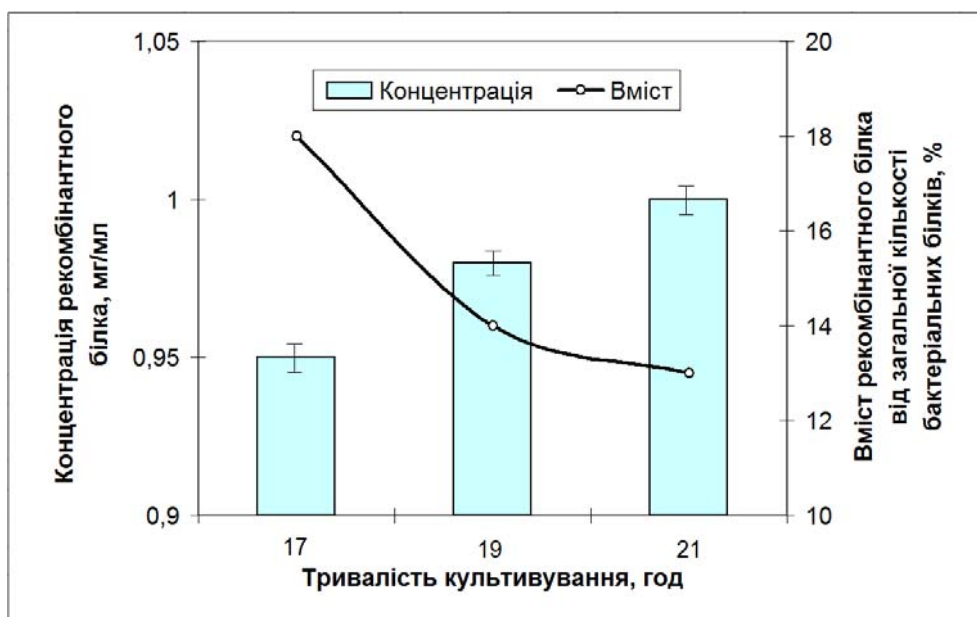
**Рис. 3.4. Електрофореграма зразків культуральної рідини – результати експресії rIL-7 в клітинах *E.coli*:**

- 1, 2 – тривалість процесу аутоіндукції 17 год, кількість проби 3 мкл;
- 3, 4 – тривалість процесу аутоіндукції 19 год, кількість проби 3 мкл;
- 5, 6 – тривалість процесу аутоіндукції 21 року, кількість проби 3 мкл;
- 7 – тривалість процесу аутоіндукції 21 год, кількість проби 1 мкл;
- MM – маркер молекулярної маси

Тому можна зробити висновок, що найоптимальнішою є тривалість культивування протягом 17 год, так як протягом подальшого часу приріст



цільового білка незначний, в порівнянні із збільшенням забруднення цільового білка білками клітин-продуцента.



**Рис. 3.5. Вихід рекомбінантного білка при різних тривалості культивування**

Наступний блок досліджень мав на меті визначення оптимального складу середовища для аутоіндукції експресії цільового білка. Дані дослідження проводили при сталій температурі культивування 37,5°C та тривалість процесу складала 17 годин. Для дослідження використовували наступні склади середовищ для аутоіндукції:

№1 – пептон, дріжджовий екстракт,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза,  $\text{NaHCO}_3$  та хлорамфенікол;

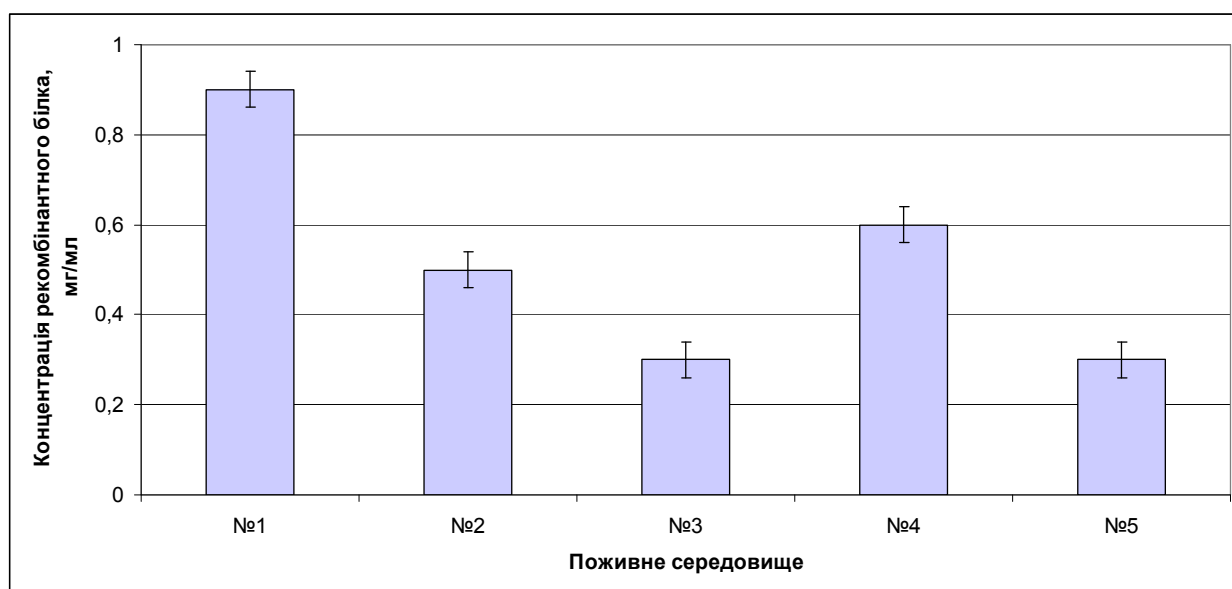
№2 – пептон, дріжджовий екстракт,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза,  $\text{NaHCO}_3$  та хлорамфенікол;

№3 – пептон, дріжджовий екстракт,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза,  $\text{NaHCO}_3$  та хлорамфенікол;

№4 – пептон, дріжджовий екстракт,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза та хлорамфенікол;

№5 – пептон, дріжджовий екстракт,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , лактоза $\times 2$ , гліцерол, глюкоза, D-мальтоза,  $\text{NaHCO}_3$  та хлорамфенікол.

На рис 3.6 наведено результати робіт із культивування продуцента рІІ-7 на середовищах для аутоіндукції, склад яких вказано вище. Проведення процедури аутоіндукції біосинтезу рекомбінантного білка проводили шляхом культивування продуценту в круглодонних колбах об'ємом 1 л на орбітальній качалці. Процес оцінювали за значенням оптичної густини культуральної рідини та концентрації цільового білка, що розраховувалась методом денситометрії.

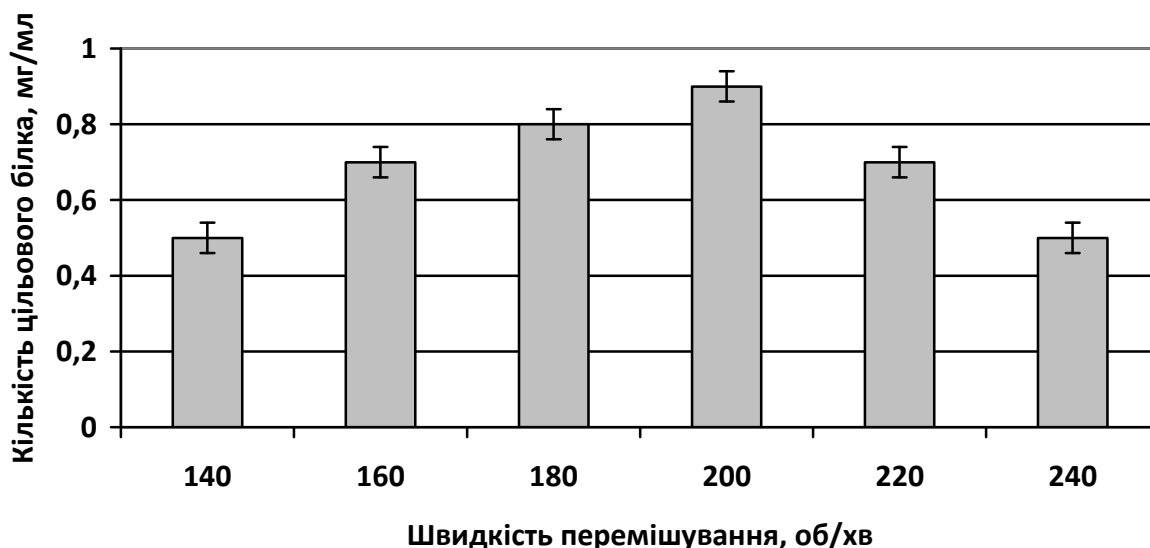


**Рис. 3.6. Визначення оптимального складу середовища для аутоіндукції**

Отже, найкращим виявилось середовище №1, а найгірші результати було отримано при використанні поживних середовищ № 3 та №5.

Подальші дослідження були направлені на визначення оптимальної швидкості перемішування. Дані дослідження проводили при сталій температурі культивування  $37,5^{\circ}\text{C}$ , тривалість процесу складала 17 годин, для дослідження використовували середовищ для аутоіндукції №1. На рис 3.7. наведено результати культивування продуцента рІІ-7 на середовищі для аутоіндукції, при різній швидкості перемішування. Процес оцінювали за значенням

концентрації цільового білка, що розраховувалась методом денситометрії. Найкращі результати синтезу цільового білка були отримані за швидкості перемішування 200 об/хв.



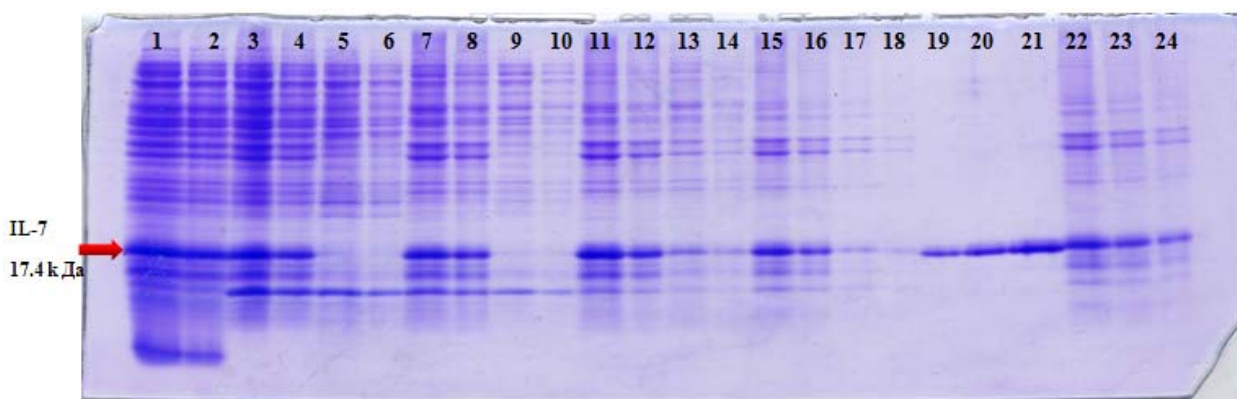
**Рис. 3.7. Визначення оптимальної швидкості перемішування під час біосинтезу рекомбінантного білка**

### 3.2. Розробка методів виділення та очистки рекомбінантного білка

Подальшим етапом було виділення та очистка ТВ за вищевказаною методикою, паралельно відбирали проби для електрофорезу в ПААГ, щоб мати змогу контролювати кожен етап. В результаті отримали ТВ, білковий склад котрих був аналізований електрофоретично (рис. 3.8). Денситометрія електрофореграми за допомогою програми TotalLab 2.0 показала, що вміст цільового білка в тільцях включення досягав 30-35% від сумарного вмісту білків клітин *E. coli*. Отримані тільця включення містили в середньому 0,7 мг/мл рІІІ-7 в перерахунку на вихідну культуру *E. coli*.

Розчинення ТВ проводилося в в буферному розчині, що містить 7М гуанідину гідрохлорид, 100мМ Тріс-НСІ, 0,2% Твін-20 та 50мМ дітіотрієтолу. Інкубували з обертанням протягом 1 години при температурі

22°C. Після інкубації отриманий розчин ТВ центрифугували при 13,2 об/хв протягом 15 хв. Надосад відбирали для подальшої ренатурації та очистки.



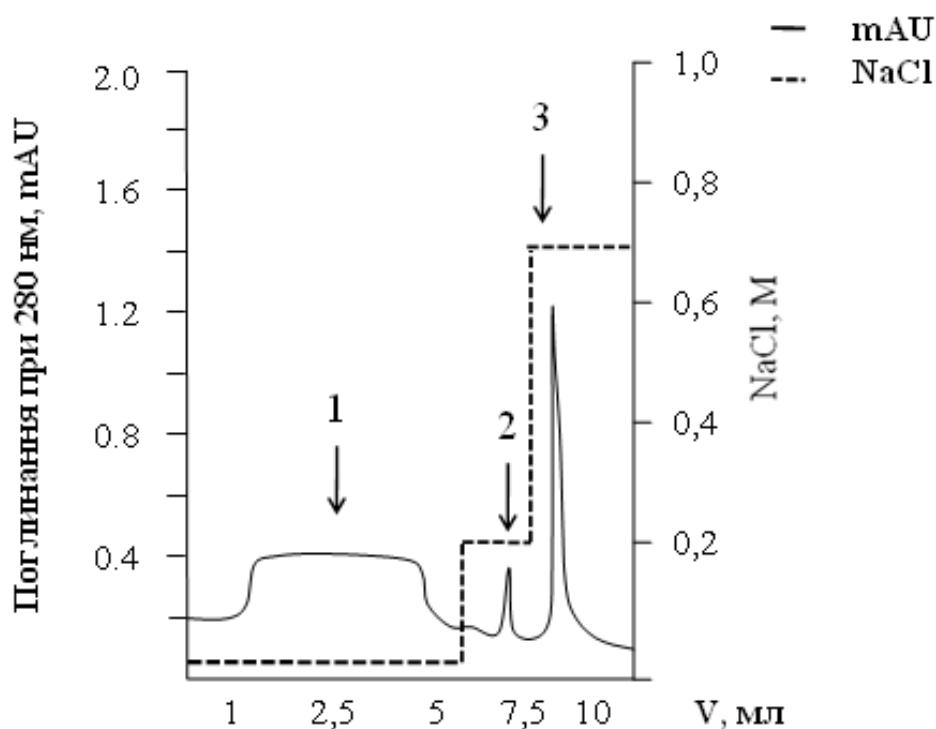
**Рис. 3.8. Електрофореграма виділення та очистки тілець включення:**

1, 2 – 5 і 2,5 мкл вихідної культури клітин *E. coli*. 3 і 4 – 5 і 2,5 мкл клітин, ресуспендованих в буферах А і В; 5 і 6 – 5 і 2,5 мкл надосаду після осадження ТВ; 7 і 8 – 5 і 2,5 мкл ТВ, ресуспендованих в буфері С; 9 і 10 – 5 і 2,5 мкл надосаду після осадження; 11 і 12 – 5 і 2,5 мкл ТВ, ресуспендованих в буфері D; 13 і 14 – 5 і 2,5 мкл надосаду після осадження; 15 і 16 – 5 і 2,5 мкл ТВ, ресуспендованих в деіонізованій воді; 17 і 18 – 5 і 2,5 мкл надосаду після осадження; 19, 20 і 21 – 0,5, 1 і 2 мкг білка-маркера FGF-1(ММ 17,0 кДа); 22, 23 і 24 – 5, 2,5 і 1 мкл (в перерахунку на вихідну культуру) очищених ТВ.

Отриманий після розчинення ТВ супернатант наносили на колонку ХК26/40 (GE Healthcare), запаковану Sephadex G-25 fine (100 мл сорбенту). Сорбент попередньо врівноважували 5 обсягами розчину Кларка-Лабса. На колонку наносили 10 мл супернатанту попереднього етапу, що містить 7,5-8 мг цільового білка. Нанесення і всі процедури хроматографічного фракціонування і подальшого центрифугування проводилися при 20-22°C. Швидкість нанесення розчину білка, а також подальшої подачі елюючого буфера становила 15 мл/хв. Обсяг елюату варіював в діапазоні від 20 до 25 мл. Отриманий елюат фільтрували через фільтр MF MembraneFilters (діаметр пор 0,45 мкм), а потім через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Після фільтрування в препарати

додавали по 1мМ окисленого та відновленого глутатіону і піддавали подальшій очистці.

Очищення рІЛ-7 після його ренатурації на колонці для гель – фільтрації проводили у два етапи з використанням Q сефарози – перший етап, і SP сефарози – другий етап. На першому етапі для проведення очистки рІЛ-7 в колонку упаковували 20 мл Q сефарози, і під'єднували до автоматизованої хроматографічної системи ВЕРХ.

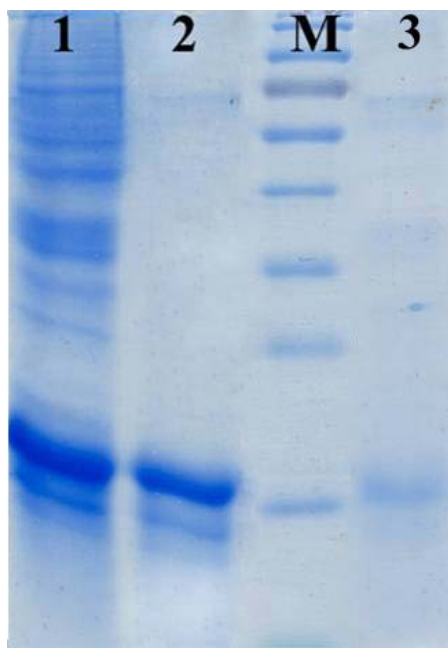


**Рис. 3.9. Профіль елюції рІЛ-7 при хроматографії на колонках з Q та SP сефарозою:**

1 – незв’язана фракція, яка пройшла через Q та SP сефарозу; 2 – фракція, елюйована 0,2М NaCl; 3 – фракція, елюйована 0,7М NaCl

Фракцію рІЛ-7, яку пропускали через Q сефарозу використовували для подальшого очищення на SP сефарозі. При рН 6,0 ІЛ-7 має позитивний заряд, в той час як більшість білків *E. coli* негативно заряджені. Оскільки Q сефароза є сильним аніонообмінником, то рІЛ-7 проходить через колонку як незв’язна фракція і одразу подається на колонку з 5 мл SP сефарози, так як обидва

сорбенти здатні функціонувати за однакових умов. Елюцію рІЛ-7 проводили двохступінчастим градієнтом NaCl (0,2 і 0,7 М) в буфері 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0; 0,1 М L-аргініну; 0,1 % Твін-80 (рис. 3.9). Для регенерації колонку промивали 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 6,0, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Твін-80 містить 2,0 М NaCl.



**Рис. 3.10. Електрофореграма очистки рІЛ-7 на Q та SP сефарозі:**

1 – фракція рІЛ-7 після ренатурації; 2 – фракція рІЛ-7 після очистки на Q і SP сефарозі; 3 – незв'язана фракція; М – маркери ММ (250, 130, 100, 70, 55, 25, 15 кДа)

Всі фракції отримані в результаті хроматографічного очищення рІЛ-7 збирали і аналізували в 12% поліакриламідному гелі (ДСН-ПААГ) і з використанням спектрофотометра NanoDrop. Вихід цільового білка після всіх етапів очистки становив 10%. Чистота препарату складала близько 90% (рис. 3.10). Після отримання, фракція, в котрій знаходився рІЛ-7 була взята для аналізу його біологічної активності.

## **Висновки до розділу 2.**

На даному етапі роботи було розроблено та обґрунтовано оптимальні параметри біотехнології отримання та очистки рІЛІ-7. Показано, що рекомбінантний білок накопичується у цитоплазмі клітин *E. coli* штаму BL21 (DE3) у вигляді тілець-включень. Встановлено оптимальні умови культивування штаму-продуценту для максимального накопичення цільового продукту: середовище для аутоіндукції №1, стала температура 37,5°C, швидкість перемішування 200 об/хв, тривалість процесу аутоіндукції 17 год. Також була розроблена методика очистки цільового продукту, яка базується на використанні гелю – фільтрації для ренатурації білка та двох етапної очистки з використанням Q сефарози – перший етап, і SP сефарози – другий етап.

### **Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. Lutsenko T.N., Galkin A.Yu. Biotechnological approaches of producing recombinant interleukin-7 human // Тези доповідей міжнародної наукової конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи в ХХІ столітті» (14-15 квітня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 47-48.

2. Motronenko V.V., Lutsenko T.M., Ruzhynska L.I., Gorshunov Yu.V., Galkin O.Yu. Comparative analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химические технологии, биотехнологии, геоэкология». – 2017. – № 2 (199). – С. 241–246. (Білорусь).

## РОЗДІЛ 4. БІОЛОГІЧНА ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНА СТАНДАРТИЗАЦІЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ

### 4.1. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на різних моделях *in vitro* як основа для його біологічної стандартизації

#### 4.1.1. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С

Для визначення цитотоксичної концентрації рІЛ-7, яка призводить до зниження виживаності тест-клітин на 50 % (CC<sub>50</sub>), використовували клітини МДВК. Діапазон досліджуваних концентрацій рІЛ-7 становив від 0,09 до 6,0 мкг/мл. Кожна концентрація аналізувалася у 10 повторях. Результати проведених досліджень представлені в таблиці 4.1. В результаті проведених досліджень цитодеструктивні зміни відмічені для концентрації препарату 6,0 мкг/мл, тобто CC<sub>50</sub> рІЛ-7 становить 3,0 мкг/мл.

Таблиця 4.1.

#### Визначення CC<sub>50</sub> препарату рІЛ-7

Концентрація препарату рІЛ-7, мкг/мл						
6,0	3,0	1,5	0,75	0,375	0,18	0,09
Цитодеструктивні зміни						
10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Антивірусну активність вивчали в культурі МДВК, яку оброблювали різними розведеннями препарату рІЛ-7 і додавали ВБВД в дозі 100 ТЦД<sub>50</sub> (ТЦД<sub>50</sub> – тканинна цитопатогенна доза, що викликає загибель 50 % клітин моношару). Культури інкубували в термостаті до специфічної цитопатогенної дії в контролі вірусу, а потім в культуральному середовищі різних розведень визначали інфекційний титр вірусу. Для встановлення ефективної дози (ED<sub>50</sub>)



досліджуваного препарату проводили визначення інфекційного титру вірусу грипу для кожного розведення сполуки. Індекс селективності (IS) препарату визначали шляхом встановлення співвідношення  $CC_{50}$  до  $ED_{50}$ , яка являє собою мінімальну кількість препарату, що гальмує розвиток вірусспецифічної цитопатичної дії (ЦПД) на 50 %. Результати відповідних досліджень наведено у таблицях 4.2 та 4.3.

Таблиця 4.2.

**Ефективна доза ( $ED_{50}$ ) препарату рІЛ-7 по відношенню до ВБВД**

Концентрації препарату в мкг/мл	Інфекційний титр вірусу в lg ID <sub>50</sub>
0,15	7,0
0,075	5,0
0,0375	3,0
0,0187	3,0
0,009	3,0
0,0047	3,0
Контроль вірусу	8,0

Аналізуючи одержані результати, слід відмітити, що препарат рІЛ-7 пригнічував репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С на 3-5 lg ID<sub>50</sub>. Згідно результатів досліджень, було показано, що препарат рІЛ-7 є ефективними інгібітором сурогатного вірусу гепатиту С – ВБВД з високим показником IS.

Для одержання продукуючих ВГС культур клітин виділяли РНК ВГС від хворих пацієнтів. Далі одержували кДНК на матриці РНК ВГС для трансфекції культур *Jurkat* та подальшого аналізу методом ПЛР (табл. 4.4).

Таким чином, в результаті трансфекції суспензійних культур *Jurkat* за допомогою трансфекційного реагента *Turbofect* одержані продукуючі культури клітин, трансфеговані кДНК ВГС, які дають стабільну продукцію вірусу гепатиту С.

Таблиця 4.3

**Результати визначення  $CC_{50}$ ,  $ED_{50}$ , IS препарату рІЛ-7**

Характеристика	Значення
$CC_{50}$	3,0 мкг/мл
$ED_{50}$	0,0047 мкг/мл
IS	640

Таблиця 4.4

**Результати трансфекції суспензійних культур *Jurkat* для отримання стабільної продукції ВГС**

Трансфекція (пасаж)	Номер зразка			
	1-3A	2-3a	3-3A	4-1b
Вірусне навантаження (г/екв.)				
2-й пасаж	2537	4485	2512	13598
5-й пасаж	3150	5400	3120	14100

Наступним етапом досліджень було визначення впливу різних доз рІЛ-7 на динаміку росту культур *Jurkat* не інфікованих гепатитом С та інфікованих ВГС. В культури клітин *Jurkat*, не інфікованих та інфікованих ВГС, у концентрації 550 тис. клітин в 1 мл додавали рІЛ-7 в дозах 2,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,025 мкг/мл на 1-у, 2-у та 3-ю добу. На кожне розведення препарату та контролю до експерименту: інтактні клітини та клітини, інфіковані продукуючим вірусом гепатиту С використовували по 5 лунок. В кожній лунці підраховували кількість живих клітин в камері Горяєва. В експерименті було 8 варіантів досліджуваних культур клітин.

Перший варіант – культури клітин *Jurkat*, інфіковані продукуючою культурою трансфегованого вірусу ВГС на 1 мл культури клітин 50 мкл ВГС – лунки №№ 1-5. Другий варіант – до культур клітин *Jurkat*, інфікованих продукуючою культурою ВГС, додавали рІЛ-7 у дозі 2,5 мкг/мл – лунки №№ 6-

10. Третій варіант – до культур клітин *Jurkat*, інфікованих продукуючою культурою ВГС, додавали рІІ-7 у дозі 0,25 мкг/мл – лунки №№ 11-15. Четвертий варіант – до культур клітин *Jurkat*, інфікованих продукуючою культурою ВГС, додавали рІІ-7 у дозі 0,025 мкг/мл – лунки №№ 16-20. П'ятий варіант – до неінфікованих культур *Jurkat* додавали рІІ-7 у дозі 2,5 мкг/мл – лунки №№ 21-25. Шостий варіант – до неінфікованих культур *Jurkat* додавали рІІ-7 у дозі 0,25 мкг/мл – лунки №№ 26-30. Сьомий варіант до неінфікованих культур *Jurkat* додавали рІІ-7 у дозі 0,025 мкг/мл – лунки №№ 31-35. Восьмий варіант – інтактні клітини *Jurkat* – лунки №№ 36-40. Результати середньої кількості клітин з 5 лунок для 8 варіантів досліду представлені в таблиці 4.5.

Аналізуючи результати впливу рІІ-7 на динаміку росту клітин *Jurkat*, інфікованих та неінфікованих ВГС, слід відмітити, що інтактні культури в динаміці постійно збільшували концентрацію клітин в мл, на 22 добу кількість клітин подвоювалася. Кількість клітин в лунках, що були інфіковані ВГС, у перші 3 доби майже не змінювалася, на 14 та 22 добу кількість клітин в 1 мл подвоїлася. Вплив рІІ-7 на інтактні клітини в перші 3 доби залежав від дози препарату: при дозі 2,5 мкг/мл кількість клітин на першу та третю добу збільшувалася на 100-200 тис.; на другу залишалася на вихідному рівні; на 14 добу збільшення клітин досягало максимуму і на 22 добу кількість клітин знижувалася. При дозі 0,25 мкг/мл – кількість клітин на 2 та 3 добу знижувалася, а на 14 добу досягала свого піку і поступово знижувалася на 22 добу. Для мінімальної дози 0,025 мкг/мл динаміка росту культур характеризувалася поступовим збільшенням клітин до 22 доби у 2-3 рази. Досліджувані нами концентрації рІІ-7 зовсім по іншому впливали на динаміку росту інфікованих ВГС клітин. На першу добу дози 0,25 мкг/мл та 0,025 мкг/мл стимулювали ріст клітин, на інші досліджувані терміни рІІ-7 у дозі 0,25 мкг/мл поступово стимулював ріст клітин. Застосування доз 2,5 мкг/мл та 0,025 мкг/мл на 2 та 3 добу зменшувало кількість клітин, на 14 та 22 добу збільшувало на 300-400 тис. та 100-200 тис. клітин/мл, відповідно.

Таблиця 4.5

**Вплив pІЛ-7 на динаміку росту інфікованих та неінфікованих ВГС  
клітин *Jurkat***

№№ лунок	Характер впливу	Кількість клітин, тис./мл				
		1 доба	2 доба	3 доба	14 доба	22 доба
1-5	ВГС	495,0	407,0	462,0	12012,0	1133,0
6-10	ВГС + pІЛ-7 2,5 мкг/мл	503,0	393,0	356,0	829,4	657,8
11-15	ВГС + pІЛ-7 0,25 мкг/мл	613,8	712,8	708,4	1225,4	1298,0
16-20	ВГС + pІЛ-7 0,025 мкг/мл	828,8	679,8	462,0	939,4	753,0
21-25	pІЛ-7 2,5 мкг/мл	750,2	514,8	602,8	1278,0	787,0
26-30	pІЛ-7 0,25 мкг/мл	591,8	382,8	411,4	1199,0	902,0
31-35	pІЛ-7 0,025 мкг/мл	332,2	678,0	796,4	904,2	1372,0
36-40	Контроль <i>Jurkat</i>	514,8	620,4	753,0	1194,0	1012,0

Таким чином, pІЛ-7 у досліджуваних дозах не мав цитотоксичного впливу на клітини *Jurkat*. Максимального росту клітини досягали на 14 добу для всіх варіантів досліду. Виражений проліферативний вплив на неінфіковані клітини *Jurkat* досягався при найменшій дозі pІЛ-7 – 0,025 мкг/мл. Вірус гепатиту С також мав проліферативний вплив на клітини *Jurkat*. pІЛ-7 у досліджуваних дозах на інфіковані ВГС культури клітин по різному впливав на проліферацію клітин у перші 3 доби та через 2-3 тижні.

Для вивчення мітотичного режиму клітин під впливом рІЛ-7 для всіх 8 варіантів досліду проведено вивчення на культурі клітин НГВЩ, інфікованих та неінфікованих ВГС. Результати представлені в табл. 4.6.

Таблиця 4.6

**Вплив рІЛ-7 на мітотичний режим клітин НГВЩ, заражених ВГС**

Характер впливу	Мітотичний індекс, ‰	Аномальні мітози, %
Контроль ВГС	21,0	38,0
ВГС + рІЛ-7 (2,5 мкг/мл)	14,0	21,4
ВГС + рІЛ-7 (0,25 мкг/мл)	14,0	21,4
ВГС + рІЛ-7 (0,025 мкг/мл)	19,0	31,5
рІЛ-7 (2,5 мкг/мл)	11,0	19,0
рІЛ-7 (0,25 мкг/мл)	14,0	26,4
рІЛ-7 (0,025 мкг/мл)	12,0	16,6
Контроль клітин	13,0	20,6

Згідно з наведеними даними, рІЛ-7 в різних дозах від 0,025 мкг/мл до 2,5 мкг/мл не впливав на мітотичний індекс клітин і на кількість аномальних форм мітозу, за винятком дози 0,25 мкг/мл, де кількість аномальних форм мітозу та показники мітотичного індексу незначно, але недостовірно, перевищувала показники інтактних клітин. При зараженні клітин ВГС та внесенні в них рІЛ-7 в різних дозах показники мітотичного індексу та аномальних форм мітозу були на рівні показника інтактних клітин, за винятком дози рІЛ-7 0,025 мкг/мл, де він незначно, але недостовірно, перевищував показник контролю клітин. Показники мітотичного індексу та аномальних форм мітозу контролю ВГС при цьому достовірно перевищували мітотичний режим інтактних клітин.

Таким чином, одержані результати дають додаткову інформацію, що мітотичний режим клітин під впливом репродукції ВГС набуває

проліферативного характеру. рІЛ-7 в різних дозах нормалізує мітотичний режим інфікованих клітин. Це може бути пов'язано як з інгібіцією репродукції ВГС, так і з нормалізацією гомеостазу клітин. Тому, на 3-ю і 5-у добу в культуральному середовищі інфікованих ВГС клітин *Jurkat* перших чотирьох варіантів дослідів було встановлено вірусне навантаження ВГС (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

**Вплив рІЛ-7 на репродукцію ВГС в культурах *Jurkat***

№ варіанту (лунки)	Вплив ВГС на рІЛ-7 на 1, 2, 3-тю добу	Вірусне навантаження в геном/екв.	
		3 доба	5 доба
I (1-5)	ВГС	69,6	51,6
II (6-10)	ВГС + рІЛ-7 (2,5 мкг/мл)	29,2	47,2
III (11-15)	ВГС + рІЛ-7 (0,25 мкг/мл)	57,8	63,0
IV (16-20)	ВГС + рІЛ-7 (0,025 мкг/мл)	68,6	46,4

В результаті проведених досліджень було показано, що тільки в II варіанті дослідження при внесенні рІЛ-7 в дозі 2,5 мкг/мл достовірно більше ніж на 50 % знижується вірусне навантаження на 3 добу. Але на 5 добу, коли в культуру клітин не вносили рІЛ-7, вірусне навантаження відновлюється. Тому було проведено нове дослідження по вивченню впливу рІЛ-7 на репродукцію ВГС з більш високими дозами препарату. Дослідження проведено за тією ж схемою, лише дози рІЛ-7 були 6 мкг/мл; 1,5 мкг/мл; 0,3 мкг/мл.

Результати визначення динаміки росту інфікованих на неінфікованих ВГС культур *Jurkat* під впливом рІЛ-7 представлені в таблиці 4.8.

Таблиця 4.8

**Вплив рІЛ-7 на динаміку росту неінфікованих та інфікованих ВГС клітин *Jurkat***

№ варіанту (лунки)	Характер впливу	Кількість клітин тис./мл			
		1 доба	2 доба	3 доба	4 доба
I (1-5)	ВГС	388,0	280,5	230,5	116,6
II (6-10)	ВГС + рІЛ-7 (6,0 мкг/мл)	354,2	268,4	233,2	162,8
III (11-15)	ВГС + рІЛ-7 (1,5 мкг/мл)	255,2	464,0	418,0	158,4
IV (16-20)	ВГС + рІЛ-7 (0,3 мкг/мл)	303,6	327,8	294,8	112,4
V (21-25)	рІЛ-7 (6,0 мкг/мл)	935,0	1405,0	464,2	413,6
VI (26-30)	рІЛ-7 (1,5 мкг/мл)	994,5	470,4	1192,4	892,8
VII (31-35)	рІЛ-7 (0,3 мкг/мл)	805,8	1738,0	1018,6	2065,8
VIII (36-40)	Контроль клітин	498,8	889,0	1564,2	1600,0

Вихідна концентрація клітин *Jurkat* була 500 тис./мл. Динаміка росту інтактних клітин була поступовою, збільшуючись в перші 3 доби. рІЛ-7 в дозі 0,3 мкг/мл з першої до четвертої доби значно збільшував проліферацію клітин. рІЛ-7 в дозі 1,5 мкг/мл на першу добу збільшував проліферацію клітин, на другу добу кількість клітин зменшувалася до значень вихідної кількості, але на 3 та 4 добу проліферація клітин збільшувалася. рІЛ-7 в дозі 6 мкг/мл збільшував проліферацію клітин в перші 2 доби, а на 3, 4 добу кількість клітин зменшувалася до вихідної.

Вірус гепатиту С поступово значно зменшував проліферацію клітин упродовж 4 доби рІЛ-7 в дозах 6 мкг/мл, 1,5 мкг/мл та 0,3 мкг/мл не впливав на проліферацію клітин, інфікованих ВГС.

Визначення впливу різних доз на репродукцію ВГС проводили методом ПЛР в культуральній рідині різних варіантів дослідження (табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Вплив рІЛ-7 на репродукцію ВГС в культурах *Jurkat*

№ варіанту (лунки)	Характер впливу	Вірусне навантаження геном/екв.							
		1 доба	Інг*, %	2 доба	Інг, %	3 доба	Інг, %	4 доба	Інг, %
I (1-5)	ВГС	2123,2		1387,0		806,0		79,2	
II (6-10)	ВГС + рІЛ-7 (6 мкг/мл)	1746,8	18	791,8	43	89,6	89	0	100
III (11-20)	ВГС + рІЛ-7 (1,5 мкг/мл)	2376,4	0	1487,0	0	1499,0	0	36,2	55
IV (16-20)	ВГС + рІЛ-7 (0,3 мкг/мл)	2159,4	0	1072,0	23	1001,2	0	0	100

\* Інг – інгібування проліферації клітин.

Згідно з отриманими результатами рІЛ-7 в дозі 6 мкг/мл на 3-ю добу знижував вірусне навантаження ВГС на 89 %, а на 4-у добу повністю гальмував репродукцію вірусу гепатиту С. При додаванні рІЛ-7 в дозі 0,3 мкг/мл також відбувалась повна інгібіція репродукції ВГС на 4-у добу. Використання дози 1,5 мкг/мл у перші 3 доби навіть незначно збільшувало вірусне навантаження, але на 4-у добу вірусне навантаження зменшувалося на 55 %.

Таким чином, на моделі сурогатного вірусу гепатиту С та продукуючої культури ВГС було показано, що рІЛ-7 дозозалежно інгібує репродукцію вірусу гепатиту С. рІЛ-7 ефективно інгібує репродукцію сурогатного ВГС в умовах *in vitro* ( $CC_{50}$  – 3 мкг/мл,  $ED_{50}$  – 4,7 нг/мл, IS – 640). Найвища проліферація інтактних Т-клітин визначається при дозах рІЛ-7 0,3 і 0,025 мкг/мл. рІЛ-7 по-



різному впливав на інфіковані ВГС культури: в перші 3 доби кількість клітин зменшувалася або не змінювалася, а через 2-3 тижні – збільшувалася майже в 2 рази. При введенні рІЛ-7 в дозі 6 мкг/мл упродовж 3 діб на 3-тю добу інгібування вірусного навантаження становило 89 %, а на 4-ту добу – 100 %; при використанні дози рІЛ-7 0,3 мкг/мл інгібіція на 4-ту добу становила 100 %; при використанні дози рІЛ-7 1,5 мкг/мл – на 55 % на 4-ту добу.

#### **4.1.2. Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на мононуклеарних клітин периферичної крові**

Метод контролю біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини базується на його здатності викликати проліферацію Т-лімфоцитів. Для контролю біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини можливе використання мононуклеарних клітин периферичної крові людини (МНПК), що отримують з донорської крові або перевиваємих клітинних ліній. На теперішній час в світі існує декілька інтерлейкін-7 залежних клітинних ліній, що можуть бути використані для контролю біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини: 1хN/2b (стромальна клітинна лінія), 2E8 (мишині В-лімфоцити), D1 (тимоцити нокаутних мишей), DW34 (пре-В-клітини), PB-1 (пре-В-клітини), Pno (Т-клітини) [89-93]. У таблиці 4.10 наведена коротка порівняльна характеристика клітинних ліній, які можуть бути використані для контролю біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини [90, 94,95].

Клітини, що використовують для контролю попередньо стимулюють фітогемаглютиніном (ФГА). У випадку використання перевиваємих клітинних ліній ріст клітин повинен завжди підтримуватися в присутності стандарту інтерлейкіну-7 людини з відомою активністю, тому з точки зору техніко-економічних показників для проведення контролю біологічної активності нами було обрано МНПК. Оцінку проліферації можливо проводити двома методами з використанням 3-(4,5-диметилтіазол-2-ил)-2,5-дифенілтетразол броміду

(МТТ-тест), або тимідину міченого тритієм (тимідиновий тест). Використання для детекції тимідину міченого тритієм має низку незручностей, які полягають в необхідності працювати з радіоактивним матеріалом, та потім його утилізувати, тому для проведення контролю біологічної активності перевагу надано МТТ-тесту.

Таблиця 4.10

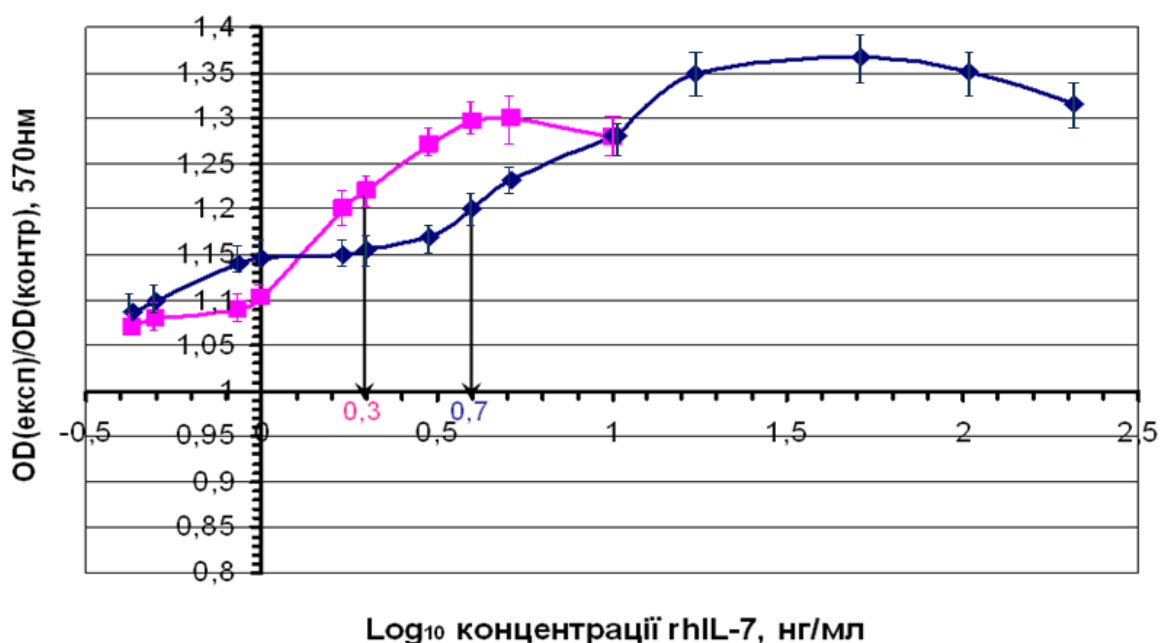
**Коротка характеристика ІЛ-7 залежних клітинних ліній**

Назва	Тип клітин	Тип залежності	Метод визначення ІЛ-7
1xN/2b	Стромальні клітини мишей	Абсолютна залежність зростання та життєздатності	Метод за допомогою тимідину міченого тритієм; МТТ-метод; ПЛР-метод визначення кількості цитокінів
DW34	Клітини кісткового мозку мишей	Повна залежність	
2E8	Клітини кісткового мозку мишей	Залежність зростання та виживання	
D1	Тимоцити нокаутних мишей	Часткова залежність	
PB-1	Клітини кісткового мозку мишей	Повна залежність	
Pno	Лімфоцити периферичної крові людей з шкірною Т-клітинною лімфомою	Часткова залежність	

З кожного окремого експерименту будували криві росту. Для побудування кривих росту культури клітин по осі абсцис відкладали

десятковий логарифм концентрації рІЛ-7, а по осі ординат – відношення поглинання контрольними зразками до поглинання експериментальних. Таких експериментів було проведено три. На рис. 4.1. зображені криві росту, які побудовані із середніх арифметичних значень цих експериментів.

На кожній кривій визначали прямолінійну ділянку, що характеризується експоненціальним ростом культивованих клітин у відповідь на дію рІЛ-7. На цій ділянці вимірювали середню точку, проекція з якої на вісь абсцис визначає половину ефективної дози (Effective dose,  $ED_{50}$ ) [60]. Перевагою такого методу вимірювання активності є те, що можна уникнути неточності, пов'язаної із індивідуальними особливостями клітин кожного донора та отримати абсолютно достовірні дані.



**Рис. 4.1. Проліферація клітин периферичної крові людини при зростаючій концентрації рІЛ-7: ■ – контроль, ♦ – досліджуваний зразок; стрілки – проекції середніх точок прямолінійних ділянок кривих на вісь абсцис; вісь абсцис – десятковий логарифм концентрації рІЛ-7, вісь ординат – відношення оптичної густини клітин, стимульованих рІЛ-7 до нестимульованих ( $OD(\text{експ})/OD(\text{контр})$ ) ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ ;  $p < 0,05$ ).**

В результаті ми отримали наступні значення  $ED_{50}$  для стандартного зразка рІЛ-7 (фірма «ReproTech») та зразка субстанції виробництва ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» – 2 нг/мл та 5 нг/мл, відповідно. Це дає нам підстави вважати, що отриманий нами рІЛ-7 має відповідну біологічну активність.

#### **4.2. Валідація методики визначення біологічної активності рІЛ-7 на основі МТТ-тесту**

*Оцінка специфічності аналізу.* Специфічність характеризує спроможність методу оцінювати біологічну активність саме аналізованої речовини у присутності інших компонентів, що можуть бути присутні у зразку. А так як визначення біологічної активності являється одним із ідентифікаційних методів, що використовуються для контролю активних фармацевтичних інгредієнтів та готових лікарських засобів на основі рІЛ-7, то специфічність є доказом того, що ідентифіковано саме аналізовану речовину.

Визначення специфічності методу контролю біологічної активності рІЛ-7 виробництва ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» проводять на МНПК людини в порівнянні з контролем біологічної активності рІЛ-7 стандартного зразка (Reprotech, Cat.N. 200-07) RSD не має перевищувати 2 %.

*Оцінка діапазону застосування (ДЗ) та лінійності.* Для вивчення даних валідаційних характеристик використовували отриманий рІЛ-7 в наступних розведеннях: 0,125 нг, 0,25 нг, 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 6 нг в мл в середовищі для культивування МНПК. Контроль кожного розведення проводили в трьох повторях. Відповідні результати наведено у табл. 4.11 та на рис. 4.2.

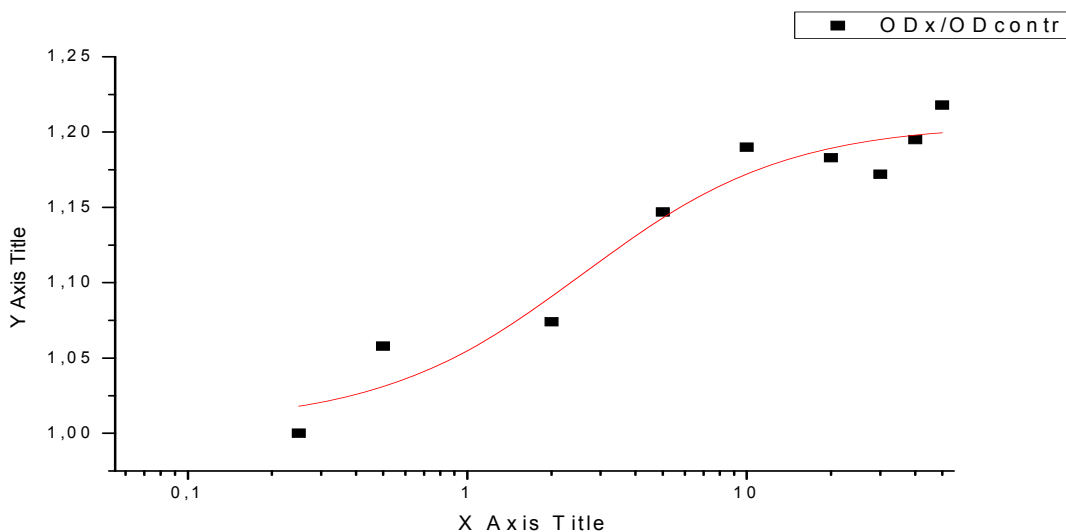
*Оцінка правильності та прецизійності.* Як відомо прецизійність може розглядатися на різних рівнях, зокрема: збіжність (intra assay variation) характеризує варіації при постановках аналізу за тих самих умов протягом невеликого проміжку часу; внутрішньолaboratorна прецизійність (inter assay variation) враховує внутрішньолaboratorні варіації; відтворюваність

характеризує ступінь близькості результатів при міжлабораторному експерименті. У нашій роботі вивчення правильності та прецизійності рекомендується проводити одночасно. Так як методика визначення біологічної активності є кількісною, тому проводили визначення в аналізі 9 розведень, концентрації яких рівномірно розподілені в досліджуваних межах застосування даної методики: 0,125 нг, 0,25 нг, 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 6 нг в мл. Контроль кожного розведення проводять в трьох повторях. Відсоток RSD було встановлено, менш ніж 2,0%. Для оцінки прецизійності було проведено даний аналіз паралельно на МНПК отриманих від двох різних донорів. Відповідні результати наведено на рис. 4.3.

Таблиця 4.11

**Результати біологічної активності rIL-7 та оцінка лінійності**

Розведення розчину, нг	Отримана оптична густина (ОГ)			Рівняння лінійної регресії	Коефіцієнт кореляції $r$ та його рівень достовірності
0,125	0,037	0,036	0,036	$y = 1,021x - 0,125$	0,995 ( $p \leq 0,01$ )
0,25	0,037	0,038	0,0038	$y = 1,001x - 0,142$	0,998 ( $p \leq 0,04$ )
0,5	0,512	0,517	0,516	$y = 1,016x - 0,124$	0,996 ( $p \leq 0,02$ )
1	0,588	0,589	0,577	$y = 1,023x - 0,128$	0,994 ( $p \leq 0,01$ )
2	0,599	0,586	0,596	$y = 1,080x - 0,111$	0,997 ( $p \leq 0,04$ )
3	0,601	0,599	0,603	$y = 1,056x - 0,118$	0,999 ( $p \leq 0,03$ )
4	0,612	0,613	0,611	$y = 1,064x - 0,101$	0,995 ( $p \leq 0,01$ )
5	0,631	0,629	0,630	$y = 1,032x - 0,106$	0,996 ( $p \leq 0,02$ )
6	0,631	0,632	0,631	$y = 1,015x - 0,114$	0,995 ( $p \leq 0,01$ )

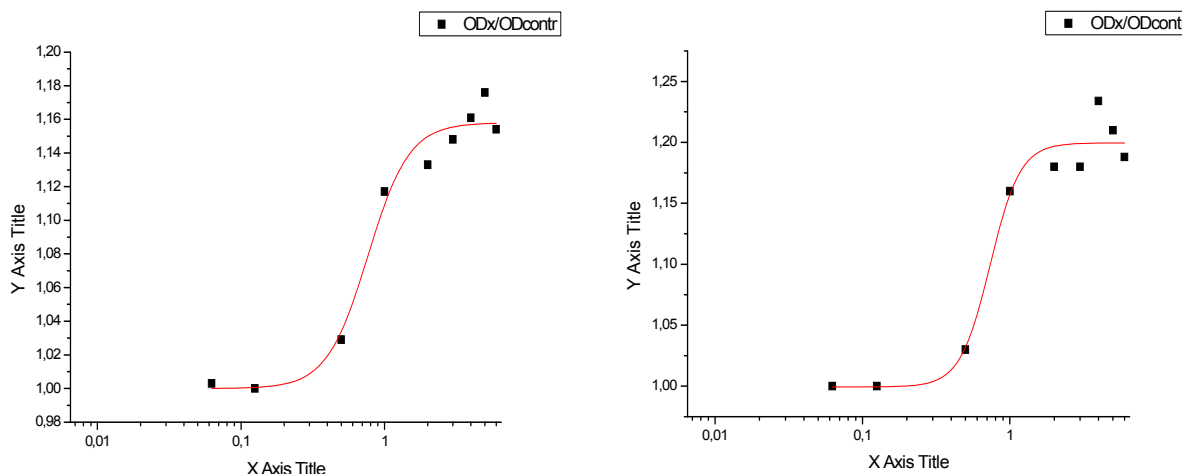


**Рис. 4.2. Встановлення лінійної залежності оптичної густини від концентрації рІЛ-7**

Вісь X – концентрація рІЛ-7 (логарифмічна шкала), вісь Y – співвідношення ОГ випробовуваного розчину до ОГ контролю.

Валідація підтверджує, що представлений метод показує задовільні дані по всіх параметрах тестування, таких як специфічність, правильність, прецизійність та лінійність.

Таким чином, на даному етапі роботи, було проведено адаптацію методики визначення біологічної активності рІЛ-7 із використанням мононуклеарних клітин периферичної крові людини. Результати здійсненої валідації даної методики за такими показниками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність довели можливість використання даного методу для рутинного аналітичного контролю якості препаратів рІЛ-7.



**Рис. 4.3. Проліферація МНПК (Протокол 1, 5 діб)**

Вісь X – концентрації рІЛ-7 (логарифмічна шкала), вісь Y – співвідношення  $OD_x$  к  $OD$  контролю. 1-й рядок: станд. – рІЛ-7: 0,0625 нг, 0,125 нг, 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 6 нг (Донор 1); 2 – рядок: станд. – рІЛ-7: 0,0625 нг, 0,125 нг, 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 6 нг (Донор 2) Обрахунок  $ED_{50}$  стандарту проводили за допомогою статистичного пакету OriginPro7,5.  $ED_{50}$  (Донор 1)  $0,7672 \pm 0,0896$  нг/мл  $ED_{50}$  (Донор 2)  $0,73524 \pm 0,0967$  нг/мл

#### **4.3. Обґрунтування параметрів аналітичної стандартизації субстанції рІЛ-7 та методів контролю якості**

##### **4.3.1. Специфікація якості**

Стандартизація АФІ на основі рекомбінантних білків потребує індивідуального підходу з врахуванням властивостей конкретної речовини. Для аналітичної стандартизації АФІ доцільним є використання наступного ряду методик, що підтверджуватимуть якість та безпечність отримуваних продуктів: електрофорез в поліакриламідному гелі, спектрофотометричні методи, специфічна активність, обернено-фазова рідинна хроматографія. Також

доцільним є використання ряду загальних методик, таких як рН та стерильність.

Окремо слід зупинитися на виборі методики визначення специфічної активності субстанції. По-перше, слід чітко визначити які методи є придатними (адекватними) для рутинного аналізу, а які можливо (доцільно) використовувати для більш поглибленого вивчення властивостей субстанції, наприклад, під час її наукового розроблення чи визначення її стабільності. З огляду на наукові дані отримані нами та описані раніше щодо прямої противірусної активності рІЛ-7 вірусологічні тести цілком можливо використовувати при вивченні стабільності АФІ під час фармацевтичної розробки. У той же час, для рутинного аналізу більш доцільно використовувати менш громісткі та більш дешеві імунологічні методи. По-друге, як ми вже зазначали (підрозділ 4.1.2) існує чимало альтернативних варіантів визначення активності ІЛ-7 із використанням різних Т-клітинних ліній тощо. З точки зору рутинного аналізу важливим є доступність відповідних клітин. У даному випадку найадекватнішим виглядає метод із використанням МНПК, у той же час доцільно передбачити використання й альтернативних методик.

Отже, на основі проведеного аналізу літературних даних [9, 30-32, 96] та власних попередніх досліджень розроблено специфікації на субстанцію на основі рІЛ-7 (табл. 4.12).

*Таблиця 4.12*

**Специфікація якості субстанції рІЛ-7  
(для виробництва нестерильних лікарських форм)**

Показник контролю	Встановлені значення	Методи контролю
Опис	Прозора безбарвна рідина, можлива слабка опалесценція, без механічних включень видимих	Візуально



Показник контролю	Встановлені значення	Методи контролю
	неозброєним оком.	
Ідентифікація		
Метод А	Ідентифікацію проводять за наявністю специфічної активності у тесті «Специфічна активність»	Власна методика
Метод Б	На електрофореграмі, одержаній в тесті на домішки, методом ДСН-ПААГ, основна смуга досліджуваного зразка повинна співпадати із основною смугою стандартного зразка	ДФУ 2.0, 2.2.31, метод ДСН-ПААГ
pH	$6,8 \pm 0,2$	ДФУ 2.0, 2.2.3, потенціометричний метод
Концентрація білка	Від 0,03 до 0,06 мг/мл	ДФУ 2.0, 2.2.25 спектрофотометричний метод
Стерильність	Субстанція повинна бути стерильною	ДФУ 2.0, 2.6.1, метод прямого висівання
Специфічна активність*	Від 3 до 6 нг/мл	
Метод А	МТТ-тест із використанням МНПК стимульованих ФГА	Власна методика
Метод Б	МТТ-тест із використанням клітинної лінії 2E8	Власна методика
Метод В	Методика із використанням	Власна методика

Показник контролю	Встановлені значення	Методи контролю
	клітинної лінії 2E8 та радіактивного тимідину	
Домішки із ММ, відмінною від ММ ІЛ-7	На електрофореграмі не має виявлятися смуга, інтенсивніша за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (d) (1.0 %), і не більше 3 смуг можуть бути інтенсивнішими за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (e) (0.2 %)	ДФУ 2.0, 2.2.31, метод ДСН-ПААГ
Чистота	Сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати 5.0 % суми площ усіх піків	ДФУ 2.0, 2.2.29, метод обернено-фазової рідинної хроматографії

Примітка: \*для рутинного аналізу використовується один із наведених методів.

#### 4.3.2. Методи контролю якості

Опис. Прозора безбарвна рідина, можлива слабка опалесценція, без механічних включень.

##### Ідентифікація.

Метод А. Субстанція повинна проявляти специфічну активність. Визначення противірусної активності проводять під час тесту «Специфічна активність».

Метод Б. На електрофореграмі, одержаній в тесті на ступінь чистоти, методом ДНС-ПААГ, основна смуга досліджуваного зразку повинна співпадати із основною смугою стандартного зразку. Визначення проводять під час тесту «Ступінь чистоти».

pH. pH має бути  $(6,8 \pm 0,2)$ . Визначають згідно з ДФУ 2.0, 2.2.3, потенціометричний метод.

Відбирають 2 мл субстанції інтерлейкіну-7, поміщають в пробірку та проводять вимірювання показника pH використовуючи для цього повірений та відкалібрований pH-метр.

Концентрація білка. Концентрацію загального білка в субстанції визначають використовуючи метод біцинхонінічної (БХК) кислоти.

Приготування реактиву біцинхонінічної кислоти (БХК). 10 г *натрію біцинхонінату Р*, 20 г *натрію карбонату моногідрату Р*, 1,6 г *натрію тартрату Р*, 4 г *натрію гідроксиду Р* та 9,5 г *натрію гідрокарбонату Р* розчиняють у воді дистильованій *Р*. Якщо необхідно, доводять pH розчину до 11,25, використовуючи розчин *натрію гідроксиду Р* або розчин *натрію гідрокарбонату Р*. Доводять об'єм до 1000 мл водою дистильованою *Р* та перемішують.

Приготування мідно-біцинхонінатового реактиву. Змішують 1 мл розчину 40 г/л *міді сульфату Р* і 50 мл БХК реактиву.

Приготування розчину порівняння. Готують вихідний розчин *альбуміну бичачого Р* - 0,05 мг/мл. Готують 8 розведень вихідного розчину, що містять від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл *альбуміну бичачого Р*.

Підготовка випробовуваного розчину. Відбирають для контролю 2 зразка по 0,1 мл субстанції. Зразок залишають не розведеним, з 2 зразка готують 3-кратне розведення.

Холостий розчин. В якості холостого розчину використовують *воду дистильовану Р*.

Виконання випробування та умови його проведення. Змішують 0,1 мл кожного розчину порівняння, випробовуваного розчину і холостого розчину з 2 мл мідно-БХК реактиву і перемішують. Розчини витримують при температурі 37°C упродовж 30 хвилин, відмічають час та залишають суміш до охолодження до кімнатної температури. Не пізніше як через 60 хв після закінчення термостатування вимірюють оптичну густину (2.2.25) кожного розчину в

кварцових кюветах за довжини хвилі 562 нм, використовуючи холостий розчин як компенсаційну рідину. Будують калібрувальний графік залежності оптичної густини кожного із 8 розчинів порівняння від вмісту білка. За калібрувальним графіком визначають вміст білка у випробуваному розчині.

Стерильність. Препарат повинен бути стерильний. Випробування проводять згідно з вимогами ДФУ 2.0, 2.6.1, метод прямого висівання. Кількість субстанції для дослідів складає 0,5 мл.

Специфічна активність.

Метод А. МТТ-тест із використанням МНПК стимульованих ФГА.

А. Виділення моноклеарів периферичної крові (МНПК) людини.

1. Зразки крові (20 мл) відбираються в пробірки з ЕДТА як антикоагулянт.
2. Кров розводиться 1:1 стерильним фізіологічним розчином у стерильній пробірці на 50 мл для культивування.
3. У 4 пробірки на 15 мл додають по 3 мл Ficoll-Paque™ PLUS (щільність 1,077 г/л) і на шарується по 8 мл розведеної крові. Пробірки центрифугують 30 хв при 1500 об/хв при кімнатній температурі в центрифугі з bucket-ротатором.
4. МНПК відбираються за допомогою стерильної піпетки на 10 мл в одну пробірку; розводяться в 2 рази фізіологічним розчином.
5. Пробірка центрифугується 10 хв при 1500 об/хв при кімнатній температурі; супернатант відкидається.
6. Клітини ресуспендують за допомогою стерильної піпетки в 10 мл стерильного фізіологічного розчину; і повторно центрифугують 8 хв при 1500 об/хв.
7. Повторити кроки 5 і 6, але ресуспендувати клітини в 10 мл середовища RPMI.
8. Ресуспендувати фінальний клітинний осад у 5 мл Blast -середовища (Blast-середовище: RPMI с 10% інактивованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби, пеніцилін/стрептоміцин, 50 мкМ 2-меркаптоетанол.)
9. Кількість життєздатних клітин оцінюється в камері Горяєва при

розведенні в 0,4% розчину трипанового синього.

10. Кількість клітин у пробірці доводиться за допомогою Blast-середовища до  $4 \times 10^6$  клітин/мл.

#### Б. Престимуляція МНПК.

1. Для стимуляції МНПК в концентрації  $1-4 \times 10^6$  клітин/мл додають ФГА (РНА Sigma L 8754) до кінцевої концентрації 10 мкг/мл і культивуються протягом 5 днів в пластикових матрацах (10 мл/матрац) при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в інкубаторі.

2. По закінченні культивування суспензія клітин переноситься в пробірки на 15 мл і відмиваються 3 рази при 1500 об/хв по 10 хвилин в середовищі RPMI з остаточним розведенням в Blast-середовищі в кількості  $4 \times 10^6$  клітин/мл. Після останнього відмивання осад клітин ресуспендується в Blast-середовищі (RPMI, ETC 10%, 50 мкМ 2-меркаптоетанол). Підрахунок клітин проводиться з фарбуванням трипановим синім.

#### С. Стимуляція Т- клітинних бластів (T cell blasts) ІЛ-7.

1. Клітини культивуються в 96 - лункових планшетах по  $1 \times 10^5$  клітин на лунку з 3 серійним розведенням рекомбінантного ІЛ-7 в діапазоні від 2нг/мл до 200 нг/мл. В якості позитивного контролю використовується людський рекомбінантний ІЛ-7 стандарного зразка. Кожне розведення повинно бути в 3 повторах, включаючи повтори з негативним контролем (додається буферний розчин без рекомбінантного білка).

2. Планшети інкубуються протягом 72 годин при 37°C в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>.

3. Після чого додають 15 мкл розчину МТТ (5 мг/мл) у кожную лунку і інкубують 4:00 при 37°C в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>.

4. Зчитувати ОГ при 540 нм після розчинення кристалів формагану в ДМСО (яке додається по 200 мкл в лунку) .

5. Після закінчення роботи клітини, посуд і використані реагенти піддаються дезобробці і викиданню в спеціальні контейнери.

Обчислення результатів.

1. Побудова графіка ОГ проти логарифма концентрації ІЛ-7 має давати сигмоїдальну криву.

2.  $ED_{50}$  (ефективна доза) обчислюється з лінійної частини графіка і представляє 50% проліферативну відповідь щодо максимального проліферативної відповіді, отриманого в лінійній частині графіка. Проліферація стимульованих ФГА клітин периферичної крові людини (після 5 діб) при збільшується концентрації рекомбінантного ІЛ-7. Концентрації ІЛ-7: 2, 5, 10, 15, 25, 30, 50, 100, 200 нг/мл. Вісь X - логарифм концентрації ІЛ-7, вісь Y – відношення ОГх до ОГ контролю.  $ED_{50}$  отриманого препарату відповідає 20 нг/мл.

#### Метод Б. МТТ-тест із використанням клітинної лінії 2E8.

Біологічну активність рІЛ-7 визначали його росто-стимулюючу дію на клітинну лінію 2E8. Клітинна лінія 2E8 підтримували в IMDM середовищі (GIBCO, Grand Island, NY), що містить 5% фетальної бичачої сироватки (FBS, Hyclone). Щоб ініціювати клітинну проліферацію, різні концентрації (1 пкг/мл - 100 нг/мл) рІЛ-7 інкубували з клітинами 2E8, в концентрації  $2 \times 10^5$  на лунку, в 96-лункових планшетах. Після інкубації протягом 48 год, проліферацію клітин виявляють за допомогою МТТ (3-(4,5-діметилтіазоліл-2) -2,5-діфенілтетразолію бромід) аналізу, для чого 10 мкл розчину МТТ (5 мг/мл МТТ в IMDM) додають в кожен лунку 96-лункових планшетах. Планшет інкубують при 37 С протягом 4 год і потім центрифугували при 8000G протягом 10 хв. В кожен лунку вносять, 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для розчинення формагану протягом 10хв. Після чого проводять вимірювання оптичної щільності на ІФА-рідері при довжині хвилі 570 нм і довжині хвилі 630 нм для отримання еталонних сигналів.

#### Метод В. Методика із використанням клітинної лінії 2E8 та радіактивного тимідину.

Дослідження на специфічну активність проводять на здатність інтерлейкіну-7 проліферувати ІЛ-7 залежні мишині пре-В-клітинні лінії 2E8 (ATCC® TIB-239™). Проби розводять до початкової концентрації 2 нг/мл і далі

серійно до мінімальної концентрації 3,05 пг/мл. Використовують 96-лункові планшети, 0,1 мл розведеного ІЛ-7 та 0,1 мл 2Е8 клітин ( $2 \times 10^5$  клітин) додають в трьох повторах, в результаті чого отримують тестовий діапазон від 1 нг/мл до 1,53 пг/мл. Клітини інкубують при 37°C протягом 48-58 год, а потім ресуспендують з 1  $\mu$ Сі тимідину міченого тритієм, витримують протягом 16-20 годин. Збирають клітини на скловолоконні фільтри з включеннями [ $^3\text{H}$ ] тимідину. Фільтри потім підраховували в лічильнику  $\beta$ .

Домішки із молекулярною масою, відмінною від молекулярної маси інтерлейкіну-7. Випробування проводять методом електрофорезу з натрію додецилсульфатом у поліакриламідному гелі (ДСН-ПААГ) згідно ДФУ 2.0, 2.2.31. Випробування проводять як у відновлювальних, так і у не відновлювальних умовах, використовуючи 13% акриламідні розділювальні гелі та забарвлювання сріблом як виявлення.

*Буферний розчин для зразків (не відновлювальні умови).* Змішують рівні об'єми води Р та ДСН-ПААГ буферного розчину для зразків концентрованого Р.

*Буферний розчин для зразків (відновлювальні умови).* Змішують рівні об'єми води Р та ДСН-ПААГ буферного розчину для зразків концентрованого (відновлювальні умови) Р, що містить 2-меркаптоетанол як відновлювальну речовину.

*Випробовуваний розчин (а).* Випробовуваний препарат, розводять буферним розчином для зразків до концентрації білка 0,025 мг/мл.

*Випробовуваний розчин (b).* 0,20 мл випробовуваного розчину (а) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (а).* Готують розчин 0.025 мг/мл відповідного стандартного зразка ІЛ-7 у буферному розчині для зразків.

*Розчин порівняння (b).* 0.20 мл розчину порівняння (а) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (c).* 0.20 мл розчину порівняння (b) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (d).* 0.20 мл розчину порівняння (c) доводять буферним

розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (e).* 0.20 мл розчину порівняння (d) доводять буферним розчином для зразків до об'єму 1 мл.

*Розчин порівняння (f).* Використовують розчин зі стандартами молекулярних мас для калібрування ДСН-ПАГ гелів в межах від 15 кДа до 67 кДа.

Випробовувані розчини та розчини порівняння поміщають у пробірки, закривають пробірки та витримують на водяній бані протягом 2 хв.

У кишеньки концентруючого гелю вносять 10 мкл розчину порівняння (f) і по 50 мкл кожного іншого розчину. Проводять електрофорез в умовах, зазначених в інструкції для приладу. Виявляють білки у гелі методом забарвлювання сріблом.

Результати випробування вважаються вірогідними, якщо валідаційні характеристики відповідають вимогам статті (2.2.31): на електрофореграмі розчину порівняння (e) виявляється смуга; інтенсивність забарвлення на електрофореграмах змінюється у такому порядку: випробовуваний розчин (a), випробовуваний розчин (b), для розчинів порівняння – від (a) до (e).

На електрофореграмі випробовуваного розчину (a) за зазначених умов можуть виявлятися, крім основної смуги, менш інтенсивні смуги білків із молекулярною масою, меншою за молекулярну масу білків на основній смузі. На електрофореграмі не має виявлятися смуга, інтенсивніша за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (d) (1,0 %), і не більше 3 смуг можуть бути інтенсивнішими за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (e) (0,2 %).

На електрофореграмі випробовуваного розчину (a), одержаної у не відновлювальних умовах, можуть виявлятися, крім основної смуги, менш інтенсивні смуги білків із молекулярною масою, більшою за молекулярну масу білків на основній смузі. На електрофореграмі не має виявлятися смуга, інтенсивніша за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (d) (1,0 %), і не більше 3 смуг можуть бути інтенсивнішими за основну смугу на



електро-фореграмі розчину порівняння (е) (0,2 %).

Чистота. Випробування проводять методом обернено-фазової рідинної хроматографії (2.2.29).

Використовують систему вискоєфективної рідинної хроматографії з колонкою 150×3,9 мм C18 (Deltapack, Waters, MA). 15 мкг зразка наносять на колонку з швидкістю 1 мл/хв. Процедура елюювання білка з колонки C18 проводять лінійним градієнтом від 90% буферу А (0,1% розчин трифтороцтової кислоти в воді Р) до 70% буферу Б (0,1 % трифтороцтової кислоти, 99,9% ацетонітрилу для хроматографії). Розділення проводять при температурі навколишнього середовища, швидкість потоку 1 мл/хв протягом 30 хв, детекція при довжині хвилі 210 нм. Хроматограму аналізують та визначають площу усіх піків, та суму площ усіх піків крім основного.

Сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати 5,0 % суми площ усіх піків.

#### **Висновки до розділу 4.**

На моделі сурогатного вірусу гепатиту С та продукуючої культури ВГС було показано, що рІЛ-7 дозозалежно інгібує репродукцію вірусу гепатиту С. рІЛ-7 ефективно інгібує репродукцію сурогатного ВГС в умовах *in vitro* (CC<sub>50</sub> – 3 мкг/мл, ED<sub>50</sub> – 4,7 нг/мл, IS – 640). Найвища проліферація інтактних Т-клітин визначається при дозах рІЛ-7 0,3 і 0,025 мкг/мл. рІЛ-7 по-різному впливав на інфіковані ВГС культури: в перші 3 доби кількість клітин зменшувалася або не змінювалася, а через 2-3 тижні – збільшувалася майже в 2 рази. При введенні рІЛ-7 в дозі 6 мкг/мл упродовж 3 діб на 3-тю добу інгібування вірусного навантаження становило 89 %, а на 4-ту добу – 100 %; при використанні дози рІЛ-7 0,3 мкг/мл інгібіція на 4-ту добу становила 100 %; при використанні дози рІЛ-7 1,5 мкг/мл – на 55 % на 4-ту добу.

Було проведено адаптацію методики визначення біологічної активності рІЛ-7 із використанням моноклеарних клітин периферичної крові людини. Результати здійсненої валідації даної методики за такими показниками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність довели можливість

використання даного методу для рутинного аналітичного контролю якості препаратів рІЛ-7.

Було проведено наукове обґрунтування параметрів аналітичної стандартизації субстанції рІЛ-7 та розроблено методи контролю її якості.

**Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. Порва Ю.І., Рибалко С.Л., Дядюн С.Т., Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Похолоenko Я.О., Горбатюк О.Б. Дослідження протівірусної активності рекомінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С // Наукові вісті НТУУ «КШ». – 2015. – №3. – С. 52–60.

2. Lutsenko T.M., Kovalenko M.V., Galkin O.Yu. Validation of biological activity testing procedure of recombinant human interleukin-7 // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, 1. – P. 82–89.

3. Луценко Т.М., Старосила Д.Б., Рибалко С.Л., Галкін О.Ю. Методи оцінки біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та дослідження стабільності препарату на його основі // Наукові вісті НТУУ «КШ». – 2016. – №3. – С. 48–54.

4. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Питання стандартизації субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Збірник тез V Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (12-13 травня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 47-48.

## **РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА СКЛАДУ, ТЕХНОЛОГІЇ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ ТА ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЯ**

Так як багато біотехнологічних компанії в світі, уже довгий час проводять дослідження стосовно шляхів застосування рІЛ-7, існує безліч публікацій стосовно проведення клінічних випробувань препаратів на основі рІЛ-7 [97-100], то одним із основних напрямків подальших досліджень повинно бути створення якісного конкурентоспроможного лікарського засобу, та вивчення нових аспектів щодо шляхів його застосування.

Розробка фармацевтичної форми нового лікарського засобу дуже важлива задача, при цьому потрібно враховувати ряд наступних аспектів: передбачуване застосування у клінічних умовах, шлях введення, системи доставки, дози, вивільнення або доставка терапевтично активної частини, а також властивості, що впливають на параметри фармакокінетики, ефективності та безпеки (наприклад, розчинення, аеродинамічні характеристики) відповідно до тієї лікарської форми препарату, що має бути розроблена.

В літературних джерелах [101-105] зустрічаються різні можливі шляхи введення рІЛ-7 і відповідно різні лікарські форми препарату: ін'єкційні, для інтраназального введення та інгаляцій, для вагінального та ректального введення (супозиторії) та лікарські форми для зовнішнього застосування (мазі, креми, суспензії, емульсії, гелі, трансдермальні пластирі, тощо). З усіх зазначених форм перевага надається ін'єкційній ГЛФ, в вигляді ліофільно висушеного порошку, так як в такій формі краще забезпечується стабільність, збільшується термін придатності та спрощуються умови зберігання.

Для забезпечення стабільності та збереження біологічної активності до лікарських препаратів на основі рІЛ-7 додають ряд допоміжних речовин, кожна з яких виконує певну функцію. До допоміжних речовин, що використовуються в технології приготування лікарських засобів пред'являють ряд вимог. Вони повинні бути біологічно нешкідливими, нетоксичними,

хімічно індиферентними по відношенню до речовин, які входять до складу препарату, матеріалів технологічного обладнання, пакувальних матеріалів, до факторів навколишнього середовища в процесі виготовлення препарату і при зберіганні, не повинні викликати алергічних реакцій та надавати лікарській формі необхідні властивості. Ці речовини повинні проявляти необхідні функціональні властивості при мінімальному вмісті в препараті. Повинні сприяти прояву необхідного фармакологічного ефекту, не піддаватися мікробній контамінації, витримувати стерилізацію, не впливати негативно на органолептичні властивості препарату або покращувати їх, бути економічно вигідними.

Для отримання ліофільних ГЛФ на основі рІЛ-7, використовують такі допоміжні речовини як: розчинники, наповнювачі, консерванти, регулятори рН, солюбілізатори, стабілізатори, кріопротектори.

Для забезпечення необхідного значення рН ГЛФ на основі рІЛ-7 використовуються буферні системи – фосфатний буферний розчин, цитратний чи ацетатний. Використання ацетатного буферного розчину (рН=4,0 – 5,0) для створення ін'єкційної ГЛФ на основі рІЛ-7, доцільніше з точки зору забезпечення стійкості білкової молекули.

Роль формотворного наповнювача виконують сполуки, які вводяться до складу ГЛФ, якщо вміст діючої речовини невеликий або речовина, яка ліофілізується, є малорозчинна у воді або водно-спиртової суміші. Як наповнювачі найчастіше використовуються: високомолекулярні сполуки, полівінілпіролідон (ПВП), декстран-70; вуглеводи – сахароза, лактоза; вуглеводвмісні спирти – маніт, сорбіт; трегалоза, гліцин. Залежно від властивостей ці речовини виконують і інші функції: впливають на процес заморожування (наприклад, цукри, полімери, спирти, знижують точку замерзання води і уповільнюють її кристалізацію, змінюють точку евтектики, швидкість сушіння і кінцеву залишкову вологість), тобто виконують роль кріопротектора [10, 11].

Роль солюбілізатора та стабілізатора виконують такі речовини як твін-80, амінокислоти та білкові речовини, такі як людський альбумін. В складі ін'єкційної ГЛФ на основі рІЛ-7 ці речовини мінімізують ризик агрегації цільового білка.

Першим технологічним кроком у виробництві ін'єкційних ліофілізованих лікарських препаратів є приготування розчину, що підлягає висушуванню. У зв'язку з цим вивчаються фізико-хімічні властивості діючої речовини (субстанції) та можливі шляхи її деструкції у водному середовищі, підбираються допоміжні компоненти. Іншими дослідниками запропоновано, що допоміжні речовини наступного складу дозволяють досягти гарних результатів по забезпеченню стабільності рІЛ-7: 50 мМ калій фосфатний буферний розчин з рН 6,8, або 50 мМ ацетатний буферний розчин з рН 5,0, з додатковим вмістом NaCl в концентрації до 140мМ, манітол або дектрану-70 в співвідношенні 2/1 – 6/1, твін-80, в концентрації від 0,005% до 0,1%, L-аргініну в концентрації 0,1 мМ [9].

Для створення лікарських форм місцевого застосування, ректальних та вагінальних форм до їх складу зазвичай вводять допоміжні речовини в значних кількостях, які й обумовлюють швидкість та повноту вивільнення діючої речовини, характер терапевтичної дії, консистенцію лікарського засобу та структурно-механічні властивості. До складу зазначених форм входять речовини, що виконують роль основи, солюбілізатори, емульгатори, розчинники, консерватори та антисептики, гелеутворювачі, антиоксиданти, регулятори рН, ароматизатори та барвники.

Вміст рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини в готовому препараті повинен бути адаптований так, щоб в одній дозі ГЛФ отримати кількість активного інгредієнта, яка ефективна для отримання бажаної терапевтичної відповіді на конкретну композицію і спосіб введення. Обраний рівень дозування, залежить від бажаного терапевтичного ефекту, шляхів введення, бажаної тривалості лікування та інші чинників, які визначаються під час проведення доклінічних та клінічних випробувань. Згідно літературних даних

[9, 101-106] та попередніх досліджень дозування рекомбінантного ІЛ-7 людини в готовій лікарській формі можливо від 1 до 60 мкг/кг.

### **5.1. Обґрунтування складу та технології назальної форми препарату на основі рІЛ-7**

Для розроблюваного препарату, діючою речовиною якого є рІЛ-7, як лікарську форму (ЛФ) насамперед можна обрати водні розчини. Це визначається як розчинністю рІЛ-7 у воді, так і терапевтичним призначенням препарату. На сучасному етапі досліджень з ряду вище перерахованих ЛФ обрано спрей назальний. Вибір саме цієї ЛФ оснований на особливостях інтраназального шляху введення, які пов'язані з фізіологічними властивостями слизової носа, епітелій якої пронизаний мережею кровоносних і лімфатичних судин, що забезпечує лікарській субстанції велику сорбційну поверхню і прямий шлях до системного кровотоку [107], а також на зручності в застосуванні. Про переваги цього шляху введення свідчить значне розширення в останні роки номенклатури препаратів у формі назальних спреїв як місцевої, так і системної дії.

Критерії якості розроблюваного препарату складаються з нормованих та медико-біологічних показників для лікарської форми “спрей назальний”. Нормовані показники наведено у Державній фармакопеї України (ДФУ), Європейській фармакопеї (ЄФ) та нормативних документах, що діють в Україні. Водночас медико-біологічні показники визначають на підставі всебічного аналізу результатів наукових досліджень стосовно впливу назальних лікарських засобів з різними фізико-хімічними показниками на фізіологічний стан носової порожнини, а також накопиченого наукового досвіду. Враховуючи вищенаведене, розроблено цільовий профіль якості спрею назального з рІЛ-7, в основу якого покладено вимоги до ЛФ “назальний спрей” (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

**Цільовий профіль якості спрею назального з рІЛ-7**

Аспекти цільового профілю якості	Критерії
<i>Передбачуване застосування у клінічних умовах</i>	Противірусна, протибактеріальна та імуномодельююча дія при інфекційних захворюваннях ЛОР-органів
<i>Шлях введення</i>	Назальний
<i>Лікарська форма</i>	Назальний спрей
<i>Сила дії дози</i>	5–20 мг/л
<i>Система контейнер/закупорювальний засіб</i>	Флакони номінальною місткістю 10 мл зі скла медичного з насосом для розпилювання, розмір крапель не перевищує 10 мкм [108]
<i>Критерії якості лікарського препарату</i>	
<i>Прозорість</i>	Повинен бути практично прозорим, згідно з ДФУ
<i>pH</i>	Від 6,5 до 8,0 [109]
<i>Осмоляльність/ Розрахункова осмолярність</i>	Розрахунковій осмолярності 170–1370 мосмоль/л [109]
<i>Мікробіологічна чистота</i>	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше ніж $10^2$ мікроорганізмів (аеробних бактерій і грибів сумарно) у мл, згідно з ДФУ 2.0
<i>Кількісний вміст</i>	95 % – 105%
<i>Кількісний вміст антимікробних консервантів, антиоксидантів та інших допоміжних речовин</i>	90 % – 110 % / 95 % – 105%

Аспекти цільового профілю якості	Критерії
<i>Об'єм вмісту контейнера</i>	10 мл препарату
<i>Термін зберігання</i>	1...2 роки
<i>Умови зберігання</i>	(2–8) °C або (5–25) °C

У переліку показників якості, що наведений в табл. 5.1, ґрунтуючись на наукових знаннях і досвіді, можна визначити як потенційні критичні показники якості лікарського препарату наступні: осмолярність, рН, кількісний вміст АФІ і антимікробних консервантів, мікробіологічна чистота, умови зберігання. Ці показники необхідно враховувати на різних етапах життєвого циклу ЛЗ.

#### 5.1.1. Обґрунтування складу допоміжних речовин

Склад препарату у формі назального спрею вибрано відповідно до розробленого цільового профілю якості. Допоміжні речовини в назальних спреях виконують такі функції: збільшення розчинності діючих речовин, створення або стабілізація необхідного значення рН, забезпечення стабільності лікарського засобу, за необхідності в'язкість, запобігання контамінації і розвитку мікроорганізмів у лікарському засобі.

Хімічної стабільності препаратів на основі біологічно активних речовин (БАР) досягають введенням стабілізаторів, що виконують різні функції. У науковій літературі [110–112] є посилання на застосування в таких препаратах як стабілізаторів амінокислот (аргінін, лізин, гістидин, гліцин), моно-, ди- і полісахаридів, цукрових спиртів (сорбітол), поверхнево-активних речовин (ПАР) (полісорбат 20, полісорбат 80). Для одержання водних розчинів діючих речовин на основі БАР може бути застосована комплексна стабілізація, що забезпечується, наприклад, введенням до складу полімеру, антиоксиданту, комплексоутворювача та різних буферних розчинів.

Для лікарських форм, що призначені для багаторазового введення, використовують антимікробні консерванти для запобігання контамінації і розвитку мікроорганізмів, назву і кількість яких вказують на етикетці



контейнера. Необхідний термін зберігання назальних спреїв забезпечується ефективністю дії антимікробних консервантів. У назальних спреях як консерванти використовують бензалконію хлорид, кислоту *n*-гідроксибензойну, хлорбутанол, метилпарабен, пропілпарабен, спирт бензиловий, тіомерсал, кислоту сорбінову. Ефективним підходом до вирішення проблеми антимікробного захисту лікарських препаратів вважають застосування комбінації консервантів, що дає змогу застосовувати їх у нижчих концентраціях, наприклад, поєднуючи ніпагін з ніпазолом та едетатом натрію, бензалконію хлорид із едетатом натрію, хлоргексидин із едетатом натрію, едетат натрію із спиртом бензиловим [109, 113, 114].

Враховуючи несумісність більшості антимікробних консервантів з БАР (наприклад, бензалконію хлорид) [109, 113, 114], нами розглянуто можливість застосування нижченаведених речовин.

Парабени (ніпагін, ніпазол) є ефективніші проти дріжджів і цвілі, ніж проти бактерій, діють повільно, неефективні відносно синьогнійної палички. Їх ефективність залежить від рН (активні в області рН від 4 до 8, із збільшенням рН ефективність падає через утворення фенолят-іона) і довжин алкільного радикала (збільшується із зростанням числа атомів вуглецю). Парабени мають обмежену розчинність, яка зменшується зі збільшенням розміру алкільного радикала. У зв'язку з цим приготування їх розчинів вимагає підвищеної температури. Парабени схильні до гідролізу з утворенням малоактивної *n*-гідроксибензойної кислоти у слаболужних розчинах і у присутності слабких лугів та сильних кислот. Термічна стабільність також залежить від рН середовища. Для збільшення активності ці речовини застосовують переважно в комбінації з діючою концентрацією 0,2 % [113, 114].

Бензиловий спирт володіє бактеріостатичною дією і використовується як антимікробний консервант у різних ЛФ, включаючи пероральні і парентеральні лікарські форми, в концентраціях до 2,0% об/об проти грампозитивних бактерій, цвілі, грибків і дріжджів. Типовою концентрацією є 1% об/об, яку

можна використовувати в продуктах з білками, пептидами і низькомолекулярними речовинами. Оптимальною є активність при рН нижче 5; незначною є активність при рН понад 8. Антимікробна активність знижується в присутності неіонних ПАР, таких як полісорбат 80. Проте зниження активності менше, ніж у випадку з ефірами гідроксибензоату або четвертинними амонієвими сполуками [113, 114]. Активність бензилового спирту може також зменшуватися внаслідок несумісності з деякими пакувальними матеріалами, зокрема з поліетиленом. Бензиловий спирт окиснюється повільно на повітрі до бензальдегіду і бензойної кислоти; він не вступає в реакцію з водою. Водні розчини можуть бути стерилізовані фільтрацією або автоклавуванням; деякі розчини можуть розкладатися до бензальдегіду при автоклавуванні.

Деякі консерванти неефективні проти деяких штамів синьогнійної палички. Ефективним способом підвищення дії є комбінування з ЕДТА та її солями (типовий представник в назальних препаратах – едетат натрію) [113, 114]. Слід зазначити, що едетат натрію не є прямим консервантом. У назальних препаратах його використовують для посилення антимікробної активності інших консервантів проти грамнегативних бактерій як синергіст. Механізм дії пов'язаний з утворенням едетатом натрію хелатних комплексів з іонами магнію і кальцію, які здійснюють іонне зшивання ліпополісахаридів в мембрані мікробної клітини. Внаслідок цього вивільняються ліпополісахариди, що сприяє збільшенню проникності клітинної мембрани. Едетат натрію використовують не лише як синергіст антимікробної дії консервантів, але й як синергіст антиоксидантної дії при використанні в комбінації з прямими антиоксидантами або самостійно, зв'язуючи іони заліза, марганцю, міді, що є каталізаторами реакції окиснення лікарських речовин. Зазвичай використовують в концентрації 0,005–0,1 %.

Вибір антимікробних консервантів для назальних спреїв є доволі складним етапом розроблення, оскільки необхідно врахувати одразу багато важливих моментів: сумісність активного інгредієнта з допоміжними речовинами, оптимальну концентрацію для забезпечення необхідної

антимікробної дії, відсутність токсичної і подразнювальної дії у вибраній концентрації, стабільність, відсутність взаємодії з матеріалами первинної упаковки і матеріалами обладнання, що використовується у технологічному процесі.

Таблиця 5.2

### Функціональне призначення допоміжних речовин

Назва допоміжної речовини	Нормативне посилання	Призначення
Вода для ін'єкцій (очищена)	ДФУ	Розчинник
Спирт бензиновий	ДФУ, ЄФ	Антимікробний консервант
Гідроксипропілметилцелюлоза (гіпромелоза, ГПМЦ)	ЄФ	Стабілізатор
Динатрію едетат (трилон Б)	ДФУ, ЄФ	Комплексоутворювач, посилювач антиоксидантної дії та дії антимікробного консерванту
Поліетиленгліколь 100 (макрогол 400)	ДФУ, ЄФ	Стабілізатор
Ніпагін (метилпарагідрокси-бензоат)	ДФУ, ЄФ	Антимікробний консервант
Полівінілпіролідон (ПВП)	ДФУ, ЄФ	Стабілізатор

Отже, можна зробити такий висновок: стабільність спрею залежить від складових препарату, рН, матеріалу пакування, наявності іонів важких металів, умов зберігання препаратів, технології приготування. Тому розроблення нового препарату вимагає комплексного підходу та застосування різних методів стабілізації. Для вибору допоміжних речовин всебічно аналізовано склади препаратів з біологічно активними речовинами у формі розчинів, присутніх на фармацевтичному ринку, а також описаних у науковій літературі [115].

Враховуючи форму рІІ-7, в який діюча речовина застосовується в дослідженнях, було обрано такі допоміжні речовини: антимікробні консерванти – ніпагін та бензиловий спирт; посилювач антимікробної дії консервантів та синергіст антиоксидантної дії – едетат натрію; стабілізатори – полівінілпіролідон (ПВП), поліетиленгліколь 400 (ПЕГ-400), гіпромелоза (ГПМЦ) (табл. 5.2).

### 5.1.2. Розроблення технологічного процесу

Розроблення технології виготовлення назальних спреїв передбачає вивчення технологічних параметрів та режимів приготування розчину активного інгредієнта та допоміжних речовин, вивчення сумісності складу назальних спреїв з фільтрувальним матеріалом, процесу фільтрації. Оскільки для стабілізації (хімічної та мікробіологічної) препарату обрано речовини різної хімічної природи, розробляли технологію для декількох складів.

Більшість речовин, які обрали для досліджень складу назальних спреїв, добре розчинні у воді при кімнатній температурі відповідно з нормативною документацією, і їх розчинність набагато вища, ніж обрані концентрації. Водночас кожна речовина завдяки фізико-хімічним властивостям має свої особливості. Для розроблення оптимальних параметрів технологічного процесу з врахуванням фізико-хімічних і технологічних властивостей діючих і допоміжних речовин (розчинність, змочуваність, час розчинення) ми визначили температурний і часовий режими приготування та порядок введення компонентів до розчину.

Дослідження показали, що ПВП та ГПМЦ володіють відносно поганою змочуваністю, тому їх розчинення у воді супроводжується утворенням грудок, внаслідок чого час розчинення збільшується. Одним з прийомів усунення цього є розчинення за підвищеної температури розчину, що також призводить до скорочення часу розчинення речовини. Використання підвищеної температури передбачає необхідність наявності технологічного обладнання для нагрівання та охолодження розчину, що приводить до додаткових енерго- і водовитрат.

ПЕГ-400 розчиняється у воді у будь-яких співвідношеннях. Проте завдяки тому, що ця допоміжна речовина є в'язкою рідиною, виникають труднощі з її кількісним перенесенням до реактора. Також доцільно попередньо розчиняти ПЕГ-400 в окремій ємності у невеликій кількості води з подальшим кількісним перенесенням отриманого розчину до реактора.

Едетат натрію добре розчинний у воді, його обрана концентрація не впливає на швидкість розчинення інших компонентів.

Низька розчинність ніпагіну у воді (1 г / 500 мл при температурі 25 °С, 1 г / 20 мл – при температурі 100 °С) створює певні труднощі під час приготування назальних препаратів у вигляді розчинів у необхідній концентрації, що потребує збільшення часу або температури розчинення.

Розчинення бензилового спирту не викликає труднощів під час приготування розчину, враховуючи його розчинність у воді (4 г у 100 г води).

Враховуючи вищенаведену інформацію для приготування обраних досліджуваних складів препарату, запропоновано такі технології (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

**Режим приготування модельних розчинів назального спрею**

Компонентний склад розчину, г/л	Режим приготування		
	Температура, °С	Час перемішування, хв	Швидкість перемішування, об/хв
Склад 1			
Вода очищена – 0,85 л, ніпагін – 1,71 г	20-25	10-15	150
Розчин ніпагіну – 0,85 л, динатрію едетат – 0,54 г	20-25	5-10	150
Розчин ніпагіну та динатрію едетату – 0,85 л, ПВП – 18,0 г	20-25	20-30	150

Компонентний склад розчину, г/л	Режим приготування		
	Температура, °С	Час перемішування, хв	Швидкість перемішування, об/хв
Розчин ніпагіну, динатрію едетату та ПВП – 0,85 л, розчин рІЛ-7 – 0,1 л	20-25	5-10	150
Розчин ніпагіну, динатрію едетату, ПВП та розчин рІЛ-7 – 0,95 л, вода очищена до 1 л	20-25	10-15	150
Склад 2			
Вода очищена – 0,85 л, ніпагін – 1,71 г	20-25	10-15	150
Розчин ніпагіну – 0,85 л, динатрію едетат – 0,54 г	20-25	5-10	150
Розчин ніпагіну та динатрію едетату – 0,85 л, ГПМЦ – 9,0 г	20-25	20-30	150
Розчин ніпагіну, динатрію едетату та ГПМЦ – 0,85 л, розчин рІЛ-7 – 0,1 л	20-25	5-10	150
Розчин ніпагіну, динатрію едетату, ГПМЦ та розчин рІЛ-7 – 0,95 л, вода очищена до 1 л	20-25	10-15	150
Склад 3			
Вода очищена – 0,85 л, ніпагін – 1,71 г	20-25	10-15	150
Розчин ніпагіну – 0,85 л, динатрію едетат – 0,54 г	20-25	5-10	150

Компонентний склад розчину, г/л	Режим приготування		
	Темпера- тура, °С	Час перемішу- вання, хв	Швидкість перемішу- вання, об/хв
Розчин ніпагіну та динатрію едетату – 0,85 л, ПЕГ 400 – 18,0 г	20-25	5-10	150
Розчин ніпагіну, динатрію едетату та ПЕГ 400 – 0,85 л, розчин рІЛ-7 – 0,1 л	20-25	5-10	150
Розчин ніпагіну, динатрію едетату, ПЕГ 400 та розчин рІЛ-7 – 0,95 л, вода очищена до 1 л	20-25	10-15	150
Склад 4			
Вода очищена – 0,85 л, бензиловий спирт – 16,2 г	20-25	5-10	150
Розчин бензилового спирту – 0,85 л, динатрію едетат – 0,54 г	20-25	5-10	150
Розчин бензилового спирту та динатрію едетату – 0,85 л, ПЕГ 400 – 18,0 г	20-25	5-10	150
Розчин бензилового спирту, динатрію едетату та ПЕГ 400 – 0,85 л, розчин рІЛ-7 – 0,1 л	20-25	5-10	150
Розчин бензилового спирту, динатрію едетату, ПЕГ 400 та розчин рІЛ-7 – 0,95 л, вода очищена до 1 л	20-25	10-15	150

На підставі проведення досліджень було розроблено наступні склади препарату (табл. 5.4.) та технологічну та апаратурну схеми виробництва (рис. 5.1 та рис. 5.2).

Таблиця 5.4

**Склади препарату та їх фізико-хімічна характеристика**

Складові, фізико-хімічні показники	Концентрація, г/л			
	Склад 1	Склад 2	<b>Склад 3</b>	Склад 4
Натрію ацетат	0,41	0,41	0,41	0,41
Оцтова кислота 1 М	0,021	0,021	0,021	0,021
Аргініну гідрохлорид	2,1	2,1	2,1	2,1
Натрію хлорид	0,818	0,818	0,818	0,818
Полісорбат 80	0,1	0,1	0,1	0,1
Динатрію едетат	0,54	0,54	0,54	0,54
Ніпагін	1,71	1,71	1,71	—
ПВП	18,0	—	—	—
ГПМЦ	—	9,0	—	—
ПЕГ 400	—	—	18,0	18,0
Бензиловий спирт	—	—	—	16,2
Вода очищена	до 1 л	до 1 л	до 1 л	до 1 л
<i>Осмолярність</i>	<i>22,1</i>	<i>22,1</i>	<i>22,1</i>	<i>160,7</i>
<i>pH</i>	<i>4,0</i>	<i>5,0</i>	<i>5,0</i>	<i>5,0</i>

Примітка: вміст рІЛ-7 для всіх варіантів складу 5-20 мг/л.



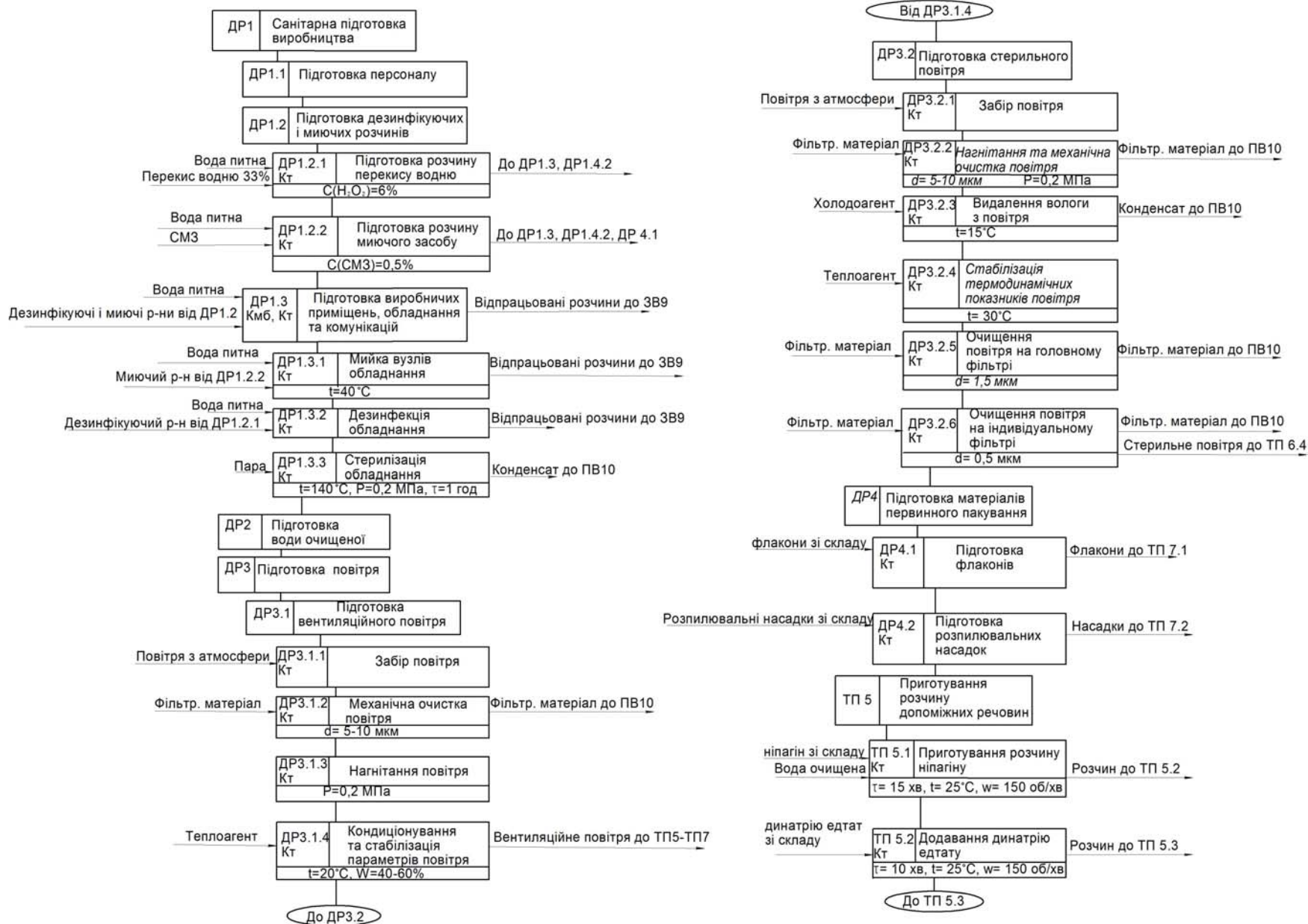
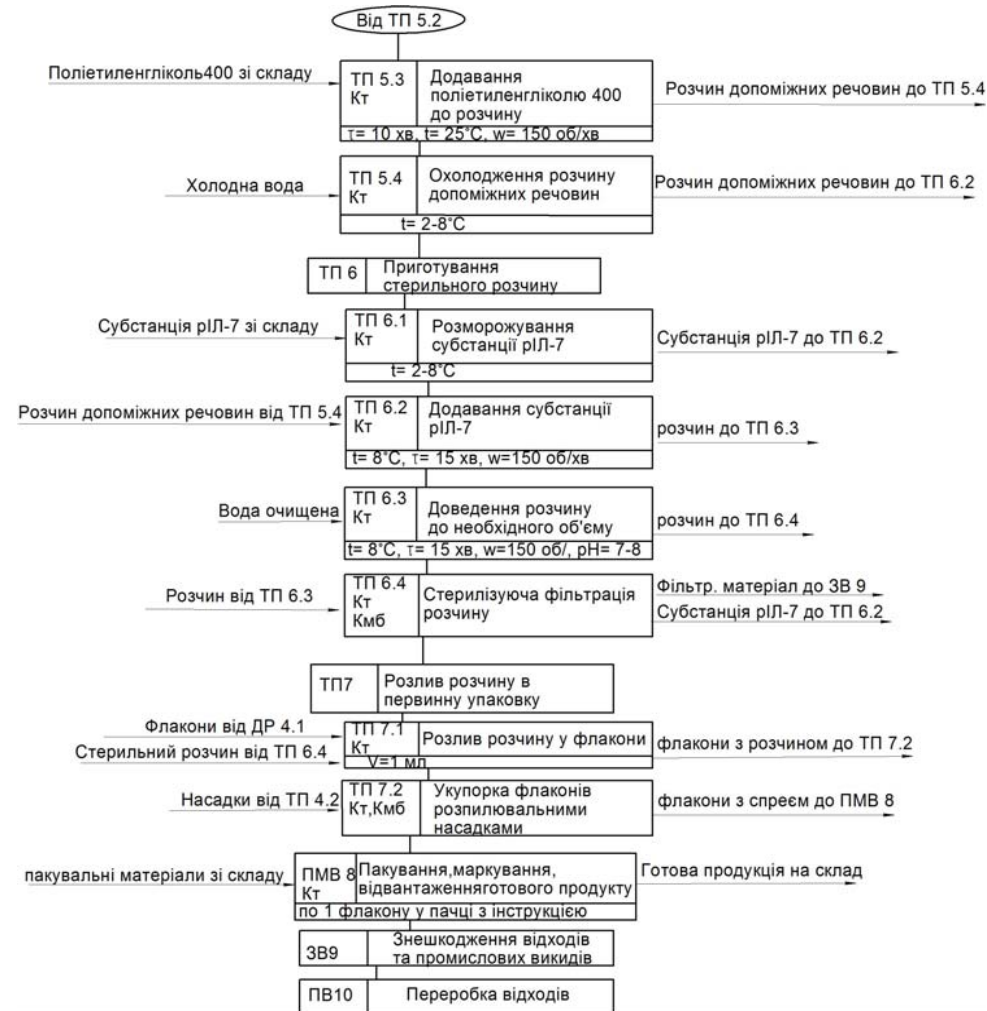


Рис. 5.1. Технологічна схема отримання назального спрею на основі рІЛ-7



**Рис. 5.1. Технологічна схема отримання назального спрею на основі рІЛ-7 (закінчення)**



Технологічний процес виробництва спрею назального на основі рІЛ-7 складається з наступних стадій (рис. 5.1 та 5.2).

#### ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

Проводиться підготовка до роботи персоналу, приміщень, обладнання та комунікацій.

##### ДР 1.1. Підготовка персоналу.

Персонал переодягається в технологічний одяг та проводить санітарну обробку рук. Персонал, що проводить технологічний процес отримання стерильного розчину повинен попередньо повести переодягання в комплект стерильного технологічного одягу і обробку рук дезінфікуючим розчином.

##### ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих і миючих розчинів.

Проводять приготування 0,5% розчину миючого засобу та 6% розчину перекису водню, які використовуються на подальших етапах підготовки виробництва.

##### ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень, обладнання та комунікацій.

Проводять очищення обладнання за допомогою 0,5% розчину миючого засобу, дезінфекцію 6% розчином перекису водню, після чого проводять 5 кратну відмивку обладнання водою очищеною від залишків миючих і дезінфікуючих розчинів. Після чого проводять стерилізацію збірника для приготування розчину та фільтруючого обладнання при наступному режимі:  $t=140^{\circ}\text{C}$ ,  $P=0,2\text{ МПа}$ , тривалість процесу 1 год. Проводять обробку робочих поверхонь, стін та підлоги 0,5% розчином миючого засобу.

#### ДР 2. Підготовка води очищеної.

Підготовку води очищеної проводять за допомогою системи виробництва води очищеної до якої входить система попередньої підготовки води та установка 2-х ступеневого зворотного осмосу.

#### ДР 3. Підготовка повітря.

##### ДР 3.1 Підготовка вентиляційного повітря.

Підготовку вентиляційного повітря для виробничих приміщень проводять на припливній вентиляційній системі, що оснащена системою трьохступеневої очистки і кондиціонування повітря, яка складається з системи фільтрів, центрального кондиціонера і витяжної системи. Витяжна система оснащена фільтрами і аспіраційним вентилятором з м'якою вставкою. Параметри повітря для виробничих приміщень:

- температура  $21 \pm 2$  °C взимку і  $23 \pm 2$  °C влітку в чистих приміщеннях;
- відносна вологість не більше 60 % з врахуванням технологічних вимог.

#### ДР 3.2. Підготовка стерильного повітря.

Для отримання стерильного повітря повітря проходить послідовну очистку на фільтрах тонкої очистки повітря з діаметром пор 1,5 мкм та 0,5 мкм.

#### ДР. 4. Підготовка матеріалів первинного пакування.

##### ДР 4.1. Підготовка флаконів.

Для розфасовки спрею назального на основі рІЛ-7 використовують пластикові флакони, які приходять на склад стерильні запаковані в групову тару в вигляді палет з флаконами покритих плівкою поліетиленовою та гофрокартонний ящик. При отриманні зі складу проводять обробку ящика 0,5% розчином миючого засобу, після чого розпаковують ящик з гофрокартону дістають палети з флаконами та проводять обробку поліетиленової упаковки 6% розчином перекису водню, після чого їх передають на технологічну стадію ТП 7.1.

##### ДР 4.2. Підготовка розпилювальних насадок.

Розпилювальні насадки, приходять на склад стерильні запаковані в поліетиленовий пакет та гофрокартонний ящик. При отриманні зі складу проводять обробку ящика 0,5% розчином миючого засобу, після чого розпаковують ящик з гофрокартону дістають палети з флаконами та проводять обробку поліетиленової упаковки 6% розчином перекису водню, після чого їх передають на технологічну стадію ТП 7.2.

#### ТП 5. Приготування розчину допоміжних речовин.

##### ТП 5.1. Приготування розчину ніпагіну.

На даному етапі відбувається завантаження в реактор Р-1 половини необхідного об'єму води очищеної, нагрівання води очищеної в реакторі до температури 25°C, зважування наважки ніпагіну на вагах В-3 та завантажування ніпагіну в реактор. Розчинення ніпагіну відбувається при температурі 25°C, перемішуванні – 150 об/хв, протягом 15 хвилин.

#### ТП 5.2. Додавання динатрію едтату.

На даному етапі відбувається зважування наважки динатрію едтату на вагах В-3 та завантажування її в реактор Р-1 з розчином ніпагіну. Розчинення динатрію едтату відбувається при температурі 25°C, перемішуванні – 150 об/хв, протягом 10 хвилин.

#### ТП 5.3. Додавання поліетиленгліколю 400.

На даному етапі відбувається зважування наважки поліетиленгліколю 400 на вагах В-3 та завантажування її в реактор Р-1 з попередньо приготованим розчином на ТП 5.2. Розчинення поліетиленгліколю 400 відбувається при температурі 25°C, перемішуванні – 150 об/хв, протягом 10 хвилин.

#### ТП 5.4. Охолодження розчину допоміжних речовин.

Охолодження розчину допоміжних речовин відбувається шляхом подачі в рубашку реактора Р-1 холодної води та перемішування розчину 150 об/хв. Контроль отриманого розчину проводять шляхом перевірки рН за допомогою рН-метру.  $\text{pH}=7-8$ .

#### ТП 6. Приготування стерильного розчину.

Технологічний процес приготування стерильного розчину складається з наступних етапів:

##### ТП 6.1. Розморожування субстанції рІЛ-7.

На даному етапі субстанцію рІЛ-7 отриману зі складу розморожують в холодильнику при температурі 2 – 8°C до повного розморожування.

##### ТП 6.2. Додавання субстанції.

На даному етапів відбувається завантаження в реактор наважки субстанції рІЛ-7 в реактор Р-1 з розчином допоміжних речовин з ТП 5. Розчинення рІЛ-7

відбувається при температурі 2 – 8°C, перемішуванні – 150 об/хв, протягом 15 хвилин.

ТП 6.3. Доведення розчину до необхідного об'єму.

На даному етапі відбувається доведення розчину до необхідного об'єму шляхом завантаження потрібної кількості води очищеної в реактор Р-1. Після чого відбувається контроль рН за допомогою рН-метра, який має складати 7-8.

ТП 6.4. Стерилізуюча фільтрація розчину.

Отриманий розчин з реактора (Р-1) насосом (Н-2) подають через установку для фільтрації (Ф-5) с з встановленими мембранами DURAPORE с розміром пор 0,45 та 0,22 мкм. Фільтрацію розчину здійснюють в стерильну ємність (З-6).

Після закінчення фільтрації із ємності (З-6) відбирають пробу для контролю стерильності. Отриманий відфільтрований розчин поступає на позицію наповнення ТП 7.

ТП 7. Розлив розчину у первинну упаковку.

ТП 7.1. Розлив розчину у флакони.

Технологічну стадію проводять у приміщенні класу чистоти В (у ламінарному потоці повітря) по нормам вмісту у повітрі механічних часток та мікробної контамінації.

Перед початком робіт апаратник одягає спеціальний одяг та інші засоби індивідуального захисту, перевіряє справність припливно-витяжної вентиляції.

Стерильні флакони надходять з ДР 4.1. Перевіряють на стерильність.

Розчин спрею назального з рІЛ-7 надходить із стадії ТП-6 в стерильній ємності (З-6). Розлив виконують на робочому столі у ламінарному потоці повітря за допомогою машини наповнення (ПМ-7). Доза наповнення складає 1,0 мл.

В процесі розливу апаратник перевіряє дозу наповнення кожні 50-60 хвилин. Об'єм наповнення флаконів перевіряють каліброваним шприцом.

ТП 7.2. Укупорка флаконів розпилювальними насадками.

Технологічну стадію проводять у приміщенні класу чистоти В (у ламінарному потоці повітря) по нормам вмісту у повітрі механічних часток та мікробної контамінації. Перед початком робіт апаратник одягає спеціальний одяг та інші засоби індивідуального захисту, перевіряє справність припливно-втяжної вентиляції.

Флакони з стерильним розчином спрею назального з рІЛ-7 закупорюють за допомогою машини наповнення (ПМ-7) стерильними розпилювальними насадками отриманими з ДР 4.2. Далі обтисненні флакони подають на стіл (С-8) для перегляду якості укупорки.

ПМВ 8. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту.

Маркування флаконів проводять на напівавтоматі (М-9), де наклеюють етикетку на липкій основі, на якій вказано: виробник, його товарний знак та адресу, назва засобу українською або російською мовами, міжнародну непатентовану назву (МНН), активність засобу в МО, об'єм у мілілітрах, "Інтраназально", "Зберігати в недоступному для дітей місці", умови зберігання, номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штриховий код. Контроль друку номеру серії та терміну придатності проводять візуально.

Флакони з нечітким, неповним написом направляють на повторне маркування.

Флакони з правильним, чітким написом вміщують в лотки та передають на стадію упаковки в пачки.

Пакування флаконів проводять на столі для пакування (С-10).

По 1 флакону спрею назального на основі рІЛ-7 разом з інструкцією по застосуванню вкладають у пачку з картону для споживчої тари з нанесеною на неї інформацією про засіб. Потім пачки з засобом пакують в групову тару, наклеюють пакувальний лист про засіб.

Кожну серію пред'являють на контроль. Контролер перевіряє зовнішнє оформлення і від кожної серії препарату відбирає проби для контролю готової продукції на відповідність вимогам.



До закінчення контролю і одержання результатів контролю серію засобу ізолюють та зберігають відповідно до умов зберігання в холодильній камері протягом проведення аналізів.

Після одержання позитивного висновку про якість засобу та відповідність вимогам нормативної документації, ВКЯ видає сертифікат якості.

Зберігають засіб в захищеному від світла місці, при температурі від 2°C до 8°C.

ЗВ 9. Знешкодження відходів та промислових викидів.

ПВ 10. Переробка відходів.

## **5.2. Дослідження стабільності назальної форми препарату на основі рІЛ-7**

Для дослідження стабільності субстанції рІЛ-7 обрали два склади стабілізуючих розчинів (допоміжних речовин) (табл. 5.4): Склад №3 (трилон Б, ніпагін, поліетиленгліколь 400) та Склад №4 (трилон Б, бензиловий спирт, поліетиленгліколь 400).

### **5.2.1. Дослідження антивірусної активності препаратів рІЛ-7 проти сурогатного вірусу гепатиту С**

Антивірусну активність вивчали в культурі MDBK, яку оброблювали різними концентраціями препарату рІЛ-7 у стабілізуючих розчинах і додавали ВБВД в дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>. Культури інкубували в термостаті до специфічної ЦПД в контролі вірусу, а потім в культуральному середовищі різних розведень препарату визначали інфекційний титр вірусу. Результати представлені в таблиці 5.5.

Таблиця 5.5

**Антивірусна активність препаратів рІЛ-7 в стабілізуючих розчинах  
проти сурогатного вірусу гепатиту С**

Досліджуваний зразок	Концентрації препарату в мкг/мл (термін зберігання – 1 тиждень)					
	0,05	0,025	0,0125	0,006	0,003	Контроль (ВБВД)
	Інфекційний титр вірусу в lg ID <sub>50</sub>					
Склад №3 + рІЛ-7	3,0	3,0	3,0	3,0	2,0	5,0
Склад №4 + рІЛ-7	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	5,0
рІЛ-7	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	5,0

Таким чином, в результаті проведених досліджень було показано, що рІЛ-7 у буферних стабілізуючих розчинах та культуральному середовищі через 1 тиждень зберігання був активним до розведення 0,003 мкг/мл проти вірусу ВБВД, тому що інгібування інфекційного титру було на 2 ID<sub>50</sub>.

**5.2.2. Дослідження антивірусної активності препаратів рІЛ-7 проти вірусу грипу**

При визначенні антивірусної активності досліджуваних препаратів в культурі клітин MDCK користувалися методом визначення інфекційного титру вірусу грипу для кожного розведення сполук. Результати проведених досліджень представлені в таблиці 5.6.

Таким чином, за результатами досліджень антивірусної активності препарату рІЛ-7 в буферних розчинах та культуральному середовищі проти вірусу грипу A/FM/H1N1/ можна зробити висновок, що зберігання препарату в буферних розчинах і в інтактному стані при температурі 4 °С протягом 1 тижня не впливало на його антивірусну активність.

Таблиця 5.6

**Антигрипозна активність препаратів рІЛ-7 в стабілізуючих розчинах**

Препарат	Концентрації препарату в мкг/мл (термін зберігання – 1 тиждень)					
	0,025	0,0125	0,006	0,003	0,015	Контроль вірусу грипу
	Інфекційний титр вірусу в lg ID <sub>50</sub>					
Склад №3 + рІЛ-7	4,0	5,0	3,0	4,0	3,0	7,0
Склад №4 + рІЛ-7	4,0	5,0	2,0	2,0	3,0	7,0
рІЛ-7	2,0	3,0	3,0	2,0	4,0	8,0

**5.2.3. Дослідження антигерпетичної активності препаратів рІЛ-7 в стабілізуючих розчинах**

Для визначення антигерпетичної активності ВПГ-2 у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1мл вносили в культуру Vero та інкубували протягом 60 хв. при температурі 37°C. Після адсорбції вірусу на клітинах залишки його видаляли, клітини промивали живильним середовищем, після чого в підтримувальне середовище (RPMI-1640 із 2% ембріональної телячої сироватки) вносили препарати у різних концентраціях. Відсутність ЦПД у дослідних зразках (оброблених культурах), при наявності його в контролі, а також зниження інфекційного титру в оброблених культурах, при наявності його в контрольних та різниця інфекційних титрів в досліді у порівнянні з контролем вірусу герпесу не менше ніж 2 lg ID<sub>50</sub>, дозволили визначити антивірусну активність препаратів (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

**Антигерпетична активність препаратів рІЛ-7 в стабілізуючих розчинах**

Препарат	Концентрації препарату в мкг/мл (термін зберігання – 1 тиждень)				
	0,025	0,0125	0,006	0,003	Контроль вірусу герпесу
	Інфекційний титр вірусу в lg ID <sub>50</sub>				
Склад №3 + рІЛ-7	5,0	4,0	5,0	7,0	7,0
Склад №4 + рІЛ-7	4,0	4,0	4,0	5,0	7,0
рІЛ-7	3,0	6,0	2,0	2,0	7,0

Таким чином, в результаті проведених досліджень було показано, що антигерпетична активність препаратів через 1 тиждень зберігання при температурі 4 °С в буферних стабілізуючих розчинах та інтактному стані залишалася ефективною.

**5.2.4. Дослідження стабільності препаратів рІЛ-7 при довготривалому зберіганні**

Дослідження антивірусної активності при зберіганні препаратів рІЛ-7 при температурі 4 °С в буферних стабілізуючих розчинах упродовж 2 тижнів та 1, 2, 3 місяців проводили проти вірусів герпесу та ВБВД (гепатит С). Відповідні дані представлено в таблиці 5.8.

Аналізуючи одержані результати досліджень по впливу препарату рІЛ-7 в буферних стабілізуючих розчинах, які плануються для виготовлення препарату в формі спрею назального та в інтактному стані на репродукцію вірусів герпесу та ВБВД, які зберігалися при температурі 4 °С упродовж 3 місяців, слід відмітити, що антивірусна активність препаратів в стабілізуючому розчині

зберігалася упродовж 3-х місяців, а в інтактному стані рІЛ-7 втрачав свою антивірусну активність через 1 тиждень у відношенні вірусу герпесу, та через 1 місяць у відношенні ВБВД. Крім того, слід відзначити, що Склад №3 забезпечував більший рівень залишкової активності препаратів рІЛ-7.

Таблиця 5.8

**Антивірусна активність проти гепатиту С та ВПГ при  
довготривалому зберіганні препаратів рІЛ-7 у стабілізуючих розчинах**

Концентрації препаратів рІЛ-7, мкг/мл	Термін зберігання	Антигепатитна активність (ВБВД)			Антигерпетична активність		
		Склад №3 + рІЛ-7	Склад №4 + рІЛ-7	рІЛ-7	Склад №3 + рІЛ-7	Склад №4 + рІЛ-7	рІЛ- 7
		Інфекційні титри вірусу в lg ID <sub>50</sub>					
0,05	2 тижні	6,0	4,0	5,0	2,0	2,0	3,0
0,025		5,0	5,0	5,0	2,0	2,0	3,0
0,012		5,0	5,0	5,0	2,0	3,0	3,0
0,006		4,0	3,0	5,0	4,0	5,0	3,0
0,003		7,0	6,0	7,0	4,0	5,0	3,0
КВ*		8,0	8,0	8,0	4,0	4,0	4,0
0,05	1 місяць	3,0	4,0	7,0	4,0	2,0	4,0
0,025		5,0	4,0	7,0	3,0	2,0	6,0
0,012		6,0	5,0	7,0	6,0	3,0	6,0
0,006		6,0	7,0	7,0	6,0	4,0	8,0
0,003		7,0	8,0	7,0	7,0	7,0	6,0
КВ		8,0	8,0	8,0	7,0	7,0	7,0
0,025	2 місяці	3,0	3,0	4,0	2,0	3,0	4,0
0,012		3,0	2,0	4,0	2,0	2,0	4,0
0,006		3,0	3,0	4,0	2,0	3,0	4,0

Концентрації препаратів рІЛ-7, мкг/мл	Термін зберігання	Антигепатитна активність (ВБВД)			Антигерпетична активність		
		Склад №3 + рІЛ-7	Склад №4 + рІЛ-7	рІЛ-7	Склад №3 + рІЛ-7	Склад №4 + рІЛ-7	рІЛ-7
		Інфекційні титри вірусу в Іg ID <sub>50</sub>					
0,003	3 місяці	3,0	2,5	5,0	2,0	3,0	4,0
КВ		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
0,05		4,0	4,0	4,0	—	—	—
0,025		5,0	3,0	4,0	—	—	—
0,012		3,0	6,0	4,0	—	—	—
0,006		4,0	6,0	3,0	—	—	—
0,003		3,0	6,0	3,0	—	—	—
КВ		6,0	6,0	3,0	—	—	—

Примітки: \* «КВ» – контроль вірусу; \*\* «—» – дослідження не проводили.

Було доведено, що запропоновані нами буферні стабілізуючі розчини забезпечують високий рівень біологічної активності препаратів рІЛ-7 при їх зберіганні за температури 4 °С упродовж 3-х місяців, що є передумовою для розробки на їх основі рідких лікарських форм фармацевтичних препаратів.

На наступному етапі роботи проводили дослідження довгострокової стабільності препарату Складу №3 при зберіганні за температури 4 °С із застосуванням методики кількісного визначення рІЛ-7 на основі ММТ-тесту при температурі (табл. 5.9).

Таким чином, на даному етапі роботи було обґрунтовано профіль якості спрею назального на основі рІЛ-7, що відповідає вимогам керівних документів, проведено розробку складів препарату та технології його виготовлення. Шляхом визначення зміни біологічної активності рІЛ-7 *in vitro* протягом 1 року (протівірусна дія щодо ВГС, ВПГ-2 та вірусу грипу; проліферація МКПК

людини) встановлено склад препарату, що забезпечує найкращі показники стабільності (рецептура на основі консерванту ніпагіну та стабілізатору ПЕГ-400).

Таблиця 5.9

**Стабільність препарату рІЛ-7 складу №3 при довготривалому зберіганні за температури 4 °С**

Вихідна концентрація рІЛ-7	Концентрація виражена у відсотках від вихідної концентрації для різних строків зберігання*					
	1 міс.	3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	13 міс.
0,05 мкг/мл	101%	100%	98%	97%	95%	95%
0,025 мкг/мл	98%	99%	95%	94%	92%	93%

\*Представлено результати тестування зразків препарату у 3-х повторях,  $p < 0,05$ .

### **5.3. Обґрунтування параметрів аналітичної стандартизації препарату на основі рІЛ-7 та методів контролю його якості**

#### **5.3.1. Специфікація якості**

Формування специфікації якості на продукцію у системі охорони здоров'я має ґрунтуватися одночасно на двох підходах: науково обґрунтованій доцільності певного тесту (виду дослідження) та вимогах національних (міжнародних) нормативних документів. Спрей назальний на основі рІЛ-7 може потенційно підпадати під визначення або лікарського засобу (згідно Закону України «Про лікарські засоби»), або медичного виробу (згідно Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753). Зважаючи на те, що дія такого препарату є місцевою (підсилення місцевого імунітету) для подальшого обґрунтування показників якості такого препарату будемо виходити із того, що розроблюваний продукт є медичним виробом III класу (як медичний виріб для

введення в організм для здійснення біологічного впливу або повного чи часткового поглинання). У той же час, специфіка форми такого препарату – спрей назальний – вимагає спеціалізованих підходів до аналітичної стандартизації, які викладено у провідних фармакопеях, зокрема у Державній фармакопеї України. Таким чином, при формуванні специфікації якості на готовий препарат ми використовували одночасно підходи, що застосовуються як для лікарських засобів, так і для медичних виробів (табл. 5.10).

Таблиця 5.10

**Специфікація якості на спрій назальний на основі рІЛ-7**

Показники контролю*	Встановлені значення	Методи контролю
Органолептичні показники	Прозора безбарвна рідина, можлива слабка опалесценція, без механічних включень видимих неозброєним оком. Запах повинен відповідати запаху використаної сировини	Візуально, органолептично
Вихід вмісту контейнера, не менше	95%	ДФУ 2.0, «Назальні краплі та рідкі назальні спреї», с. 1102
Перевірка механічного насосу	Наявність дисперсного струменю препарату після натиску на розпилювач	Власна методика
Середня маса однієї дози	Випробування проводять при кількості натисків, що дорівнює 5. Середня маса в одній дозі має бути від 0,064 г до 0,096 г	ДФУ 2.0, «Назальні краплі та рідкі назальні спреї», с. 1102
Кількість доз, що	Середня кількість доз, що	ДФУ 2.0, «Назальні



Показники контролю*	Встановлені значення	Методи контролю
витягаються	витягаються, має бути не менш ніж 250	краплі та рідкі назальні спреї», с. 1102
Водневий показник, одиниці рН	6,5-7,5	ДФУ 2.0, 2.2.3
Ідентифікація	Має проявляти специфічну біологічну активність	Власна методика
Специфічна активність	Від 80 % до 125 % від номінального значення	Власна методика
Мікробіологічна чистота	На момент випуску: Має бути стерильним	ДФУ 2.0, 2.6.1
	На момент закінчення строку придатності: Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС), КУО/мл, не більше: $10^2$ ; загальне число дріжджових і пліснявих грибів (ТУМС), КУО/мл, не більше: $10^1$ ; <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 мл: відсутні; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 мл: відсутні	ДФУ 2.0, 2.6.12, 2.6.13
Термін придатності	12 місяців за температури від 2 °С до 8 °С. Після розкриття флакону – 1 місяць за температури від 2 °С до 8 °С	–

Примітка: \*у таблиці зазначено показники якості для рутинного контролю.

### 5.3.2. Розробка методу визначення мікробіологічної чистоти препарату на основі рІЛ-7

Рекомбінантні білки, що плануються застосовувати у медицині із лікувальною чи діагностичною метою, мають відповідати специфічним вимогам, що відрізняє їх від тих білків, що використовуються виключно у науково-дослідних роботах [82, 107]. У той же час специфіка використання рекомбінантного білка також накладають специфічні вимоги щодо їх стандартизації. Одним із елементів аналітичної стандартизації фармацевтичних препаратів є розробка методів визначення мікробіологічної чистоти. Такого роду розробка є вкрай актуальною коли діючі та/або допоміжні речовини мають передбачувану або описану у літературі протимікробну дію. Виходячи із складу допоміжних речовин у розробленому препараті (табл. 5.4) він має певну протимікробну активність. У зв'язку із цим, а також виходячи із вимог ДФУ2.0, 2.6.12, 2.6.13, необхідно дослідити специфіку протимікробної активності препарату та розробити відповідні рекомендації щодо визначення його мікробіологічної чистоти.

Отже, метою даного етапу роботи було наукове обґрунтування параметрів стандартизації препарату у формі назального спрею на основі рекомбінантного ІЛ-7 людини за показником «мікробіологічна чистота» та розробка методу визначення даного показника, з урахуванням вимог керівних документів щодо якості лікарських засобів.

*Придатність методики визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів.* На першому етапі роботи нами була проведена перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів, що включена до проекту методів контролю якості на препарат рекомбінантного ІЛ-7 людини у формі назального спрею (крапель).

При висіванні на ЖС із розведення препарату 1:10 у фосфатному буферному розчині з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 препарат володів антимікробною дією по відношенню до тест-мікроорганізмів *B. subtilis* ATCC 6633 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить

антибіотик), *C. albicans* ATCC 10231 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить антибіотик). Слід зазначити, що відповідно до рекомендацій ДФУ 2.0 (2.6.12) при перевірці придатності методики з використанням методу висівання на чашки для кожного з тест-мікроорганізмів середнє арифметичне значення числа колоній, отримане у присутності випробуваного зразка та за відсутності випробуваного зразка – в контрольному досліді, має відрізнятися не більш ніж в 2 рази.

Отримані результати (табл. 5.11) спонукали нас до вивчення можливості усунення антимікробної дії препарату по відношенню до мікроорганізмів на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить антибіотик, при використанні методу прямого висівання.

Якщо спостерігається пригнічення зростання тест-мікроорганізмів (зниження числа КУО більш ніж в два рази), необхідно внести обґрунтувати та внести зміни в стандартну методику – з метою отримання вірогідних результатів випробування. У літературі [107] описано наступні прийоми для усунення та/або нейтралізації антимікробної активності: по-перше, збільшення об'єму розчинника або живильного середовища; по-друге, додавання до розчинника специфічних або неспецифічних ін активаторів; по-третє, використання методу мембранної фільтрації. Можливо використовувати комбінацію згаданих методів. Найбільш адекватним, на нашу думку, прийомом є використання нейтралізаторів, що не передбачає додаткових етапів аналізу та залучення додаткових матеріально-технічних засобів, що є особливо важливим під час рутинних досліджень серій препарату. З огляду на компонентний склад препарату (який містить ніпагін як консервант) та враховуючи дані літератури й власний досвід [107, 108, 109] ми зупинилися на таких сполуках, що потенційно мають нейтралізуючу активність по відношенню до парабенів, – лецитин та полісорбат.

Таблиця 5.11

**Результати перевірки придатності методики визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів в препараті (серія 0116)**

Тест-мікроорганізм	Середнє число КУО тест-мікроорганізму на чашках Петрі		Відношення середнього числа КУО у відсутності та у присутності препарату	Найменування ЖС
	У присутності препарату	У відсутності препарату		
Визначення ТАМС				
B. subtilis ATCC 6633	13	27	2,08	Соєво-казеїновий агар
S. aureus ATCC 6538	54	60	1,11	
P. aeruginosa ATCC 9027	83	84	1,01	
C. albicans ATCC 10231	18	43	2,39	
A. brasiliensis ATCC 16404	9	26	2,89	
Визначення ТУМС				
C. albicans ATCC 10231	20	46	2,30	Сабуро-декстрозний агар, який містить антибіотик
A. brasiliensis ATCC 16404	15	44	2,93	

Отже, для нейтралізації антимікробної дії використовували неспецифічні інактиватори полісорбат-80 та лецитин, які додавали до розчинника та живильного середовища, та метод розведення. Як розчинники для підготовки зразка використовували фосфатний буферний розчин (ФБР) з натрію хлоридом і пептоном рН 7,0 та нейтралізуючі рідини (НР), які відрізнялися за концентрацією полісорбату-80 та лецитину.

При вивченні можливості нейтралізації антимікробної дії випробувані зразки препарату готували за допомогою стерильного розчинника і додавали до зразка суспензію монокультури одного з тест-мікроорганізмів: *B. subtilis* ATCC 6633 та *C. albicans* ATCC 10231, таким чином, щоб 1 мл інокульованого зразка містив близько 100 КУО тест-мікроорганізму. В контрольному досліді таку ж кількість суспензії монокультури мікроорганізму додавали до стерильного розчинника. По 1 мл від кожного інокульованого зразка (дослідного та контрольного) висівали на 2 чашки Петрі з соєво-казеїновим агаром. Проводили інкубацію посівів при температурі від 30 °C до 35 °C протягом не більше 3 діб та підраховували число колоній, які вирости на ЖС.

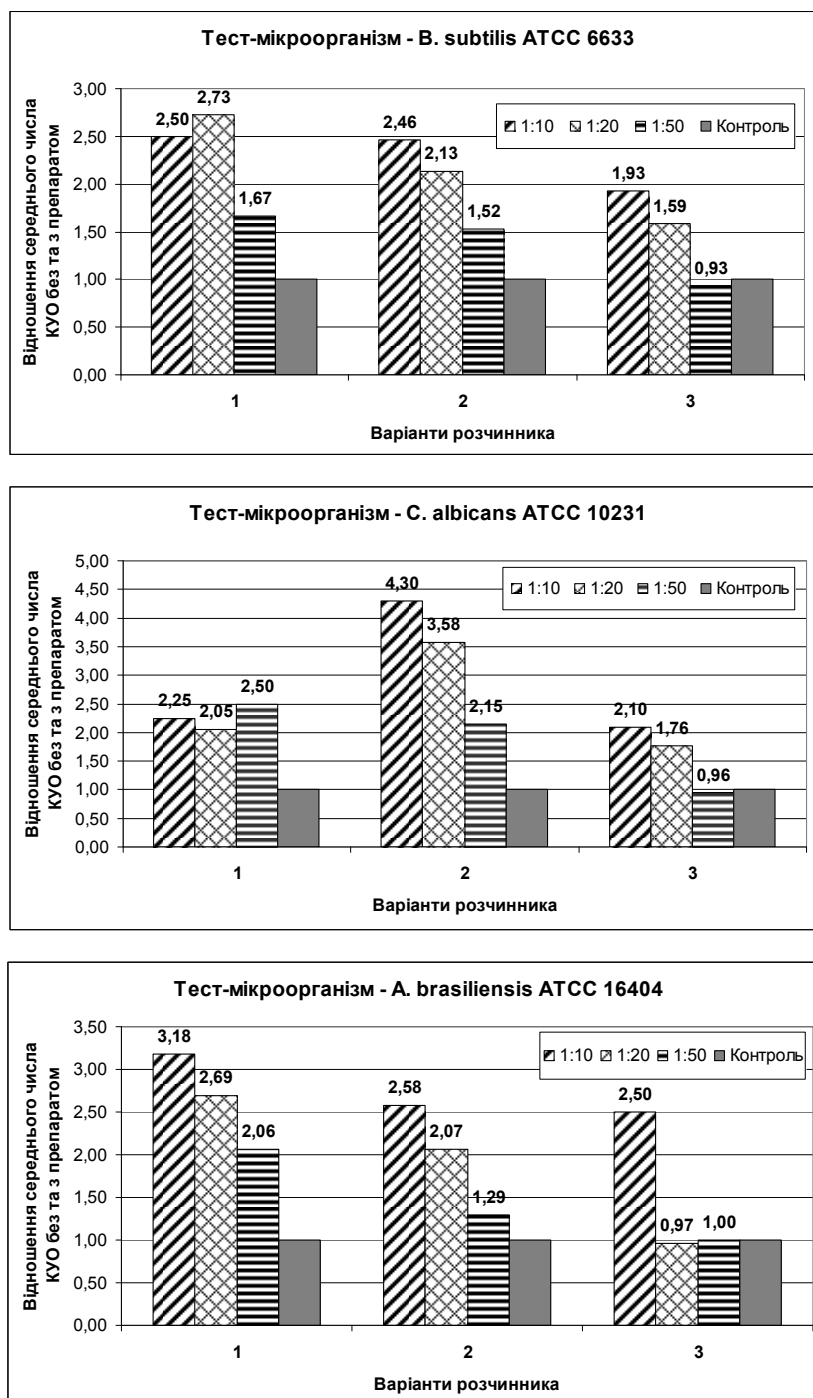
Додатково було запропоновано використання розведення 1:50, яке забезпечує часткову нейтралізацію антимікробної дії, та отримання достовірних результатів підрахунку числа життєздатних клітин. Збільшення розведення до 1:100 не є коректним, оскільки при використанні такого розведення, при проведенні контролю препарату, що містить максимально припустиме число мікроорганізмів – 1000, на кожній чашці буде спостерігатися ріст не більше ніж 10 колоній, що суттєво збільшує ризик отримання як хибнопозитивних, так і хибнонегативних результатів випробування, а також достовірність отримуваних результатів. Результати досліджень щодо нейтралізації антимікробної дії препарату (табл. 5.12, рис. 5.3 та рис. 5.4) підтверджують, що запропонована методика дозволяє ефективно усунути антимікробну дію препарату в умовах випробування на мікробіологічну чистоту.

Таблиця 5.12

## Результати вивчення можливості нейтралізації антимікробної дії препарату

Розведення	Розчинник	Середнє число КУО на чашках Петрі*		
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404
Соево-казеїновий агар				
1:10	ФБР з натрію хлоридом і пептоном, рН 7,0	12	20	11
1:20		11	22	13
1:50		18	18	17
Контроль		30	45	35
1:10	НР, з 30 г/л полісорбату-80, 3 г/л лецитину	13	10	12
1:20		15	12	15
1:50		21	20	24
Контроль		32	43	31
1:10	НР, з 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину	14	21	12
1:20		17	25	31
1:50		29	46	30
Контроль		27	44	30
Сабуро-декстрозний агар, який містить антибіотик				
1:10	НР, з 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину	Не проводили	12	11
1:20		Не проводили	30	20
1:50		Не проводили	44	34
Контроль		Не проводили	42	37

Примітка: \* – наведено дані за результатами трьох послідовних дослідів ( $p < 0,05$ ).



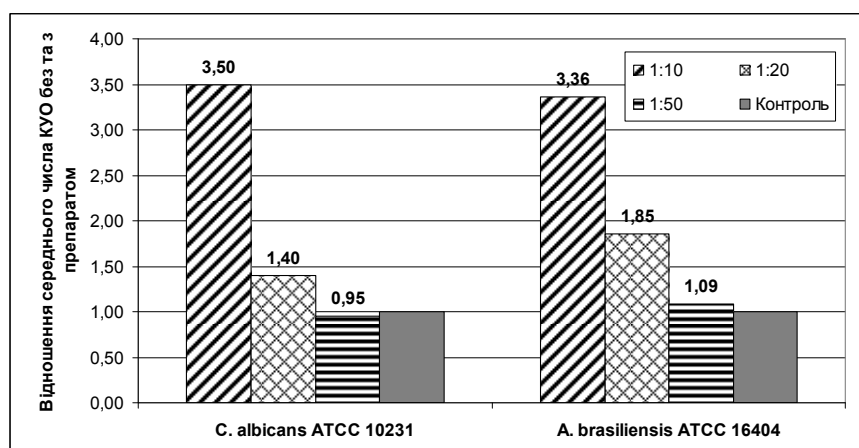
**Рис. 5.3. Результати досліджень щодо нейтралізації антимікробної дії препарату із використанням різних тест-мікроорганізмів на соєво-казеїновому агарі (розчинники: 1 – ФБР з натрію хлоридом і пептоном, рН 7,0; 2 – НР, з 30 г/л полісорбату-80, 3 г/л лецитину; 3 – НР, з 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину)**

Нормування мікробіологічної чистоти препарату встановлено відповідно до вимог ДФУ 2.0 (5.1.4) як для нестерильних лікарських засобів для

назального застосування: в препараті допускається загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не більше  $10^2$  КУО/мл, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) не більше  $10^1$  КУО/мл, не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 мл, не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл.

З метою уніфікації методів випробування мікробіологічної чистоти препарату за різними показниками при визначенні ТАМС та ТУМС, а також при випробуванні на наявність окремих видів мікроорганізмів (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) нами запропоновано використовувати той самий розчинник (нейтралізуючу рідину) із тим самим розведенням препарату (1:50). Було встановлено, що препарат за запропонованих умов випробування не володіє антимікробною дією по відношенню до тест-мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 6538 (на соєво-казеїновому агарі) та *P. aeruginosa* ATCC 9027 (на соєво-казеїновому агарі).

Таким чином, проведені випробування свідчать про те, що розроблена методика визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів для досліджуваного препарату відповідає критеріям придатності ДФУ 2.0 (2.6.12) та може бути використана при контролі мікробіологічної чистоти.



**Рис. 5.4. Результати досліджень щодо нейтралізації антимікробної дії препарату із використанням різних тест-мікроорганізмів на Сабуро-декстрозному агарі (розчинник: НР, з 50 г/л полісорбату-80, 5 г/л лецитину)**



Отже, було роведено наукове обґрунтування стандартизації препарату основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини у формі назального спрею: в препараті допускається загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не більше  $10^2$  КУО/мл, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) не більше  $10^1$  КУО/мл, не допускається наявність *S. aureus* в 1 мл, не допускається наявність *P. aeruginosa* в 1 мл. Проведено оцінку придатності методик визначення мікробіологічної чистоти. Встановлено, що досліджуваний препарат за стандартних методів дослідження володіє антимікробною активністю по відношенню до тест-мікроорганізмів *B. subtilis* ATCC 6633 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить антибіотик), *C. albicans* ATCC 10231 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить антибіотик) і не володів антимікробною дією по відношенню до тест-мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 6538 (на соєво-казеїновому агарі) та *P. aeruginosa* ATCC 9027 (на соєво-казеїновому агарі). З метою нейтралізації антимікробної активності було запропоновано та доведено ефективність використання лецитину та полісорбату як речовин, що знімають антибактеріальний ефект, у поєднанні із розведенням досліджуваного зразка у 50 разів. Розроблена методика визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів для досліджуваного препарату відповідає критеріям придатності, що пред'являються ДФУ 2.0 (2.6.12) та може бути використана при контролі його мікробіологічної чистоти.

### 5.3.3. Методи контролю якості

Опис. Визначення органолептичних показників проводять наступним чином: зовнішній вигляд та колір – візуально (при денному світлі, без використання збільшувальних приладів), запах – органолептично.

Вихід вмісту контейнера. Проводять відповідно до вимог ДФУ 2.0, 2.9.27. Вихід вмісту контейнера повинен бути не нижчим за 95 % від об'єму вмісту контейнера, зазначеної у маркуванні препарату.

Перевірка механічного насосу. На шток наносу надівають розпилювач та натискають на розпилювач не більш ніж 7 разів до появи дисперсного струменя препарату. Допускається за відсутністю струменя препарату натиснути на розпилювач ще один раз. Надалі поява дисперсного струменя препарату повинна відбуватися після першого натиску на розпилювач.

Середня маса однієї дози. Проводять відповідно до вимог ДФУ 2.0, «Назальні краплі та рідкі назальні спреї», с. 1102. Число натискувань на розпилювач – 5. Середня маса в одній дозі має бути від 0,064 до 0,096 г.

Кількість доз, що витягається. Проводять відповідно до вимог ДФУ 2.0, «Назальні краплі та рідкі назальні спреї», с. 1102. Середня кількість доз, що витягаються, має бути не менше ніж 100.

Водневий показчик рН. Від 6,5 до 7,5. Випробування проводять згідно з ДФУ 2.0, 2.2.3.

Ідентифікація. Препарат має проявляти специфічну біологічну активність. Випробування проводять паралельно із тестом «Специфічна активність».

Специфічна активність. Специфічна активність визначають шляхом оцінки проліферації Т-лімфоцитів, що стимульовані ФГА.

А. Виділення моноклеарів периферичної крові (МНПК) людини.

1. Зразки крові (20 мл) відбираються в пробірки з ЕДТА як антикоагулянт.
2. Кров розводиться 1:1 стерильним фізіологічним розчином у стерильній пробірці на 50 мл для культивування.

3. У 4 пробірки на 15 мл додають по 3 мл Ficoll-Paque™ PLUS (щільність 1,077 г/л) і нашаровується по 8 мл розведеної крові. Пробірки центрифугують 30 хв при 1500 об/хв при кімнатній температурі в центрифугі з basket-ротатором.

4. МНПК відбираються за допомогою стерильної піпетки на 10 мл в одну пробірку; розводяться в 2 рази фізіологічним розчином.

5. Пробірка центрифугується 10 хв при 1500 об/хв при кімнатній температурі; супернатант відкидається.

6. Клітини ресуспендують за допомогою стерильної піпетки в 10 мл стерильного фізіологічного розчину; і повторно центрифугують 8 хв при 1500 об/хв.

7. Повторити кроки 5 і 6, але ресуспендувати клітини в 10 мл середовища RPMI.

8. Ресуспендувати фінальний клітинний осад у 5 мл Blast -середовища (Blast-середовище: RPMI с 10% інактивованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби, пеніцилін/стрептоміцин, 50 мкМ 2-меркаптоетанол.)

9. Кількість життєздатних клітин оцінюється в камері Горяєва при розведенні в 0,4% розчину трипанового синього.

10. Кількість клітин у пробірці доводиться за допомогою Blast-середовища до  $4 \times 10^6$  клітин/мл.

#### Б. Престимуляція МНПК.

1. Для стимуляції МНПК в концентрації  $1-4 \times 10^6$  клітин/мл додають ФГА (РНА Sigma L 8754) до кінцевої концентрації 10 мкг/мл і культивуються протягом 5 днів в пластикових матрацах (10 мл/матрац) при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в інкубаторі.

2. По закінченні культивування суспензія клітин переноситься в пробірки на 15 мл і відмиваються 3 рази при 1500 об/хв по 10 хвилин в середовищі RPMI з остаточним розведенням в Blast-середовищі в кількості  $4 \times 10^6$  клітин/мл. Після останнього відмивання осад клітин ресуспендується в Blast-середовищі (RPMI, ЕТС 10%, 50 мкМ 2-меркаптоетанол). Підрахунок клітин проводиться з фарбуванням трипановим синім.

#### С. Стимуляція Т- клітинних бластів (T cell blasts) ІЛ-7.

1. Клітини культивуються в 96 - лункових планшетах по  $1 \times 10^5$  клітин на лунку з 3 серійним розведенням рекомбінантного ІЛ-7 в діапазоні від 2 нг/мл до 200 нг/мл. В якості позитивного контролю використовують робочий стандарт людського рекомбінантного ІЛ-7. Кожне розведення повинно бути в 3 повторах, включаючи повтори з негативним контролем (додається буферний розчин без рекомбінантного білка).

2. Планшети інкубуються протягом 72 годин при 37°C в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>.

3. Після чого додають 15 мкл розчину МТТ (5 мг/мл) у кожен лунку і інкубують 4:00 при 37°C в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>.

4. Зчитувати ОГ при 540 нм після розчинення кристалів формазану в ДМСО (яке додається по 200 мкл в лунку) .

5. Після закінчення роботи клітини, посуд і використані реагенти піддаються дезобробці і викиданню в спеціальні контейнери.

Обчислення результатів.

1. Побудова графіка ОГ проти логарифма концентрації ІЛ-7 має давати сигмоїдальну криву.

2. ED<sub>50</sub> (ефективна доза) обчислюється з лінійної частини графіка і представляє 50% проліферативну відповідь щодо максимального проліферативної відповіді, отриманого в лінійній частині графіка. Проліферація стимульованих ФГА клітин периферичної крові людини (після 5 діб) при збільшенні концентрації рекомбінантного ІЛ-7. Концентрації ІЛ-7: 2, 5, 10, 15, 25, 30, 50, 100, 200 нг/мл. Вісь X – логарифм концентрації ІЛ-7, вісь Y – відношення ОГх до ОГ контролю. ED<sub>50</sub> отриманого препарату дорівнює 20 нг/мл.

Мікробіологічна чистота. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 2.0 (2.6.12, 2.6.13) із урахуванням рекомендацій, що сформовано у підрозділі 5.3.2. Розробка методу визначення мікробіологічної чистоти препарату на основі рІЛ-7. Для випробування відбирають від кожної серії по 10 упаковок.

Випробування на стерильність проводять у відповідності до ДФУ 2.0 (2.6.1).

#### **5.4. Оцінка ризиків у технології препарату на основі pIL-7 та її перспективна валідація**

Управління якістю є вкрай важливим напрямком діяльності будь-якого промислового підприємства, особливо якщо мова йде про виготовлення продукції у системі охорони здоров'я (лікарські засоби, у т.ч. медичні імунобіологічні препарати, медичні вироби, косметичні засоби, дієтичні добавки тощо). Управління якістю охоплює такі процеси: формування політики у сфері якості та встановлення цілей у цій сфері, процеси, щоб досягати цих цілей через планування якості, забезпечування якості, контролювання якості та поліпшування якості. До технічних аспектів управління якістю серед іншого відносять: використання у виробництві останніх світових стандартів або стандартів, що перевищують рівень світових; контроль продукції на кожному етапі в процесі виробництва з використанням необхідних засобів контролю; забезпечення керованості всіма процесами і простежування кожної одиниці продукції; регулярний перегляд технологій [112, 113].

Базовими принципами для формування системи управління якістю є процесний підхід, елементами якого є цикл «Plan-Do-Check-Act» (PDCA) («Плануй-Виконуй-Перевіряй-Дій») та ризик-орієнтоване мислення. Ризик-орієнтоване мислення дає змогу організації визначати чинники, які можуть спричиняти відхилення її процесів та її системи управління якістю від запланованих результатів, щоб установлювати запобіжні заходи контролю для зменшення негативних впливів і якнайбільшого використання можливостей, у міру їх виникнення. Слід зазначити, що під ризиком мається на увазі вплив невизначеності, а будь-яка невизначеність може мати позитивний чи негативний впливи. Позитивний відхил, зумовлений ризиком, може забезпечувати певну можливість, але не всі позитивні впливи ризику ведуть до можливостей [112, 114].

Логічним продовженням оцінювання ризиків є валідація технологічних процесів, під якою прийнято розуміти документоване підтвердження того, що

процес, який відбувається в межах встановлених параметрів, може здійснюватися ефективно та з відтворюваними результатами і приводить до отримання цільового продукту, що відповідає заздалегідь встановленим специфікаціям і характеристикам якості. Перспективну валідацію проводять до початку серійного виробництва продукції, призначеної для продажу [115].

#### **5.4.1. Обґрунтування підходів із оцінки ризиків у технології отримання препарату**

Для виробництв різних видів продукції у сфері охорони здоров'я застосовуються різні керівні (нормативні) документи, що регламентують оцінювання ризиків та управління ними. Готовий продукт, виробництво якого має бути оцінено з позицій наявних (можливих) ризиків, виготовляється згідно з ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний. Технічні умови». Для такого роду продуктів, на нашу думку, не доцільно застосовувати підходи до оцінки ризиків на основі принципів належної виробничої практики [115], оскільки даний документ накладає додаткові вимоги та обмеження, що є актуальними саме для лікарських засобів. Загальні підходи до оцінки ризиків сформовано у стандарті ДСТУ ISO 9001:2015 «Системи управління якістю. Вимоги». Вимоги даного документу є загальними, призначеними для застосування будь-якими організаціями, незалежно від їх типу чи розміру, а також від продукції, яку вони постачають. У той же час, профілактично-гігієнічні засоби слід відносити до продукції у системі охорони здоров'я, що повинно накладати специфічні вимоги до їх виготовлення, а відтак й до оцінки ризиків. Виходячи із наведеного вище, вважаємо найбільш прийнятним застосування у даному випадку стандартів ДСТУ ISO 13485:2005 «Вироби медичні. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання» та ДСТУ ISO 14971:2009 «Вироби медичні. Настанови щодо управління ризиком» [116, 117]. Останній документ встановлює процес, згідно з яким виробник визначає небезпеки, пов'язані з медичними виробами, для визначення та оцінювання відповідних ризиків, контролювання цих ризиків та моніторингу

ефективності такого контролювання. Зазначимо, що даний стандарт не вимагає від виробника наявності системи менеджменту якості, однак управління ризиками може бути складовою частиною системи менеджменту якості.

#### **5.4.2. Оцінка ризиків виробничого процесу отримання препарату та його перспективна валідація**

Відповідно до ДСТУ ISO 14971 відсутність контролювання виробничого процесу може поставити під сумнів вимоги щодо безпеки продукції, що виробляється. Для контролювання таких ризиків важливо ідентифікувати елементи виробничого процесу. Деякі з цих ризиків можна найбільш ефективно контролювати за допомогою ретельної уваги до процесу виробництва. В таких випадках можуть бути корисними такі методи, як система аналізування ризиків та критичних контрольних точок (Hazard Analysis and Critical Control Point, НАССР), яка передбачає систематичний підхід до ідентифікації, оцінювання та контролювання небезпек. Основне зведення положень НАССР складено з семи принципів: аналізування небезпек та визначення запобіжних заходів; визначення критичних контрольних точок (ККТ); встановлення критичних обмежень; моніторинг кожного ККТ; визначення коригуючих дій; визначення процедур контролю; визначення процедур ведення записів та документації.

Отже, вихідною точкою для оцінки ризиків є аналіз технологічного процесу. Технологічна схема (ТС) виробництва наведена на рис. 5.1. Здебільшого ТС є традиційною для виробництва назальних спреїв (крапель), проте має низку особливостей, які обумовлені природою активного інгредієнта. Зважаючи на підвищену лабільність рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини (можлива інактивація під впливом підвищеної температури, а також за рахунок мікробіологічного забруднення препарату) нами було передбачено додатковий етап технології – стерилізуючу фільтрацію розчину препарату перед його розливом у первинну упаковку (флакони). Слід зазначити, що вимоги керівних документів [82] до мікробіологічної чистоти нестерильних форм для назального застосування, є не такими суrowsими: у таких препаратах

допускається загальне число аеробних мікроорганізмів не більше  $10^2$  КУО/мл, загальне число дріжджових та плісневих грибів не більше  $10^1$  КУО/мл, не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 мл, не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл.

Аналізуючи ТС нами визначено наступні ККТ: 1) підготовка матеріалів первинного пакування (полімерні флакони та розпилювальні насадки надходять на виробництво у стерильному вигляді після іонізуючої стерилізації, а відтак некоректне розкриття відповідного пакування може призводити до мікробної контамінації первинного пакування засобу) (очікуваний ризик  $R_1$ ); 2) приготування розчинів допоміжних речовин (ризики даної стадії виробництва адресовано до правильного зважування відповідних речовин та їх введення до розчину, що готується) (очікуваний ризик  $R_2$ ); 3) додавання субстанції pIL-7 до готового розчину допоміжних речовин (критичність даної стадії обумовлена лабільністю самої біологічної субстанції, про що згадувалося раніше) (очікуваний ризик  $R_3$ ); 4) стерилізуюча фільтрація розчину засобу (ризики даного процесу адресується до збереження цілісності фільтру, а також його мікробіологічної та/або хімічної контамінації) (очікуваний ризик  $R_4$ ); 5) розлив розчину у флакони та їх закупорювання (ризики даної стадії обумовлені можливістю мікробіологічної та/або хімічної контамінації продукту та відхиленням у дозуванні розчину у флакони) (очікуваний ризик  $R_5$ ).

Зазначимо, що під ризиком ми розуміємо комбінацію вірогідності виникнення шкоди та ступінь тяжкості цієї шкоди. Це не означає, що ці два фактори додають для того, щоб оцінити ризик. Зважаючи на специфіку засобу та спосіб його застосування, а також наявність обмеженого досвіду щодо технології його отримання (наразі доступні дані щодо виробництва лише дослідно-промислових серій) пропонуємо використовувати якісний підхід до аналізування ризиків. У даному випадку обрано типовий підхід – використання N-M матриці для опису вірогідності та тяжкості ризику у кожній небезпечній ситуації. Нами обрано наступні якісні рівні тяжкості: значний (зворотнє значне ушкодження або відсутність ефективності засобу), помірний (зворотнє



незначне ушкодження), незначний (не призводить до ушкодження). Якісні рівні вірогідності: високий (можливий, трапляється часто), середній (можливий, але не часто трапляється), низький (навіть чи трапиться, рідко). Таким чином, було виявлено два найбільш критичних процеси: приготування напівпродукту (ТП 5.1) та стерилізуюча фільтрація препарату (ТП 5.2) (табл. 5.13). Обидва процеси відносяться до стадії технологічної схеми ТП 5 Приготування стерильного розчину.

Таблиця 5.13

### Матриця ризиків виробничого процесу

		Якісні рівні тяжкості		
		незначний	помірний	значний
Якісні рівні вірогідності	високий		R <sub>5</sub>	R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub>
	середній	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	
	низький			

Наступним етапом роботи було проведення перспективної валідації технологічного процесу, яку вирішено проводити саме для найкритичнішої ділянки виробництва (ТП 5). Для формування валідаційного плану та його реалізації було необхідно визначити перелік найважливіших контрольних точок виробництва зазначеної стадії. У табл. 5.14 наведено результати аналізу щодо визначення контрольних точок для стадії ТП 5. Результати контролю технологічного процесу за наведеними параметрами для трьох послідовних дослідно-промислових серій препарату засвідчили відповідність фактичних значень параметрів нормативним значенням, а від так його можна вважати ефективним, стабільно повторюваним.

Таблиця 5.14

## Перелік контрольних точок виробництва стадії ТП 5 Приготування стерильного розчину

Підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ТП 5.1 Додавання субстанції рІІІ-7	Кт 5.1.1	Температура розчину	2÷8 °С	Термометр	Кожна серія
	Кт 5.1.2	Кислотність розчину	рН 7÷8	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
ТП 5.2 Стерилізуюча фільтрація розчину	Кт 5.1.3	Цілісність фільтрів*	Відсутність механічних дефектів	Дифманометр	Періодично
	Кт 5.1.4	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
	Кт 5.1.5	Температура розчину	2÷8 °С	Термометр	Кожна серія
	Кт 5.1.6	Осмоляльність	60÷80 мосмоль/л	ДФУ 2.0, 2.2.35	Періодично

\* У процесі фільтрації послідовно використовуються фільтри із розміром пор 0,45 мкм та 0,22 мкм.

## Висновки до розділу 5.

Було обґрунтовано профіль якості спрею назального на основі рІЛ-7, що відповідає вимогам керівних документів, проведено розробку складів препарату та технології його виготовлення. Шляхом визначення зміни біологічної активності рІЛ-7 *in vitro* протягом 1 року (протівірусна дія щодо ВГС, ВПГ-2 та вірусу грипу; проліферація МКПК людини) встановлено склад препарату, що забезпечує найкращі показники стабільності (рецептура на основі консерванту ніпагіну та стабілізатору ПЕГ-400).

Було проведено наукове обґрунтування стандартизації препарату основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини у формі назального спрею: в препараті допускається загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не більше  $10^2$  КУО/мл, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) не більше  $10^1$  КУО/мл, не допускається наявність *S. aureus* в 1 мл, не допускається наявність *P. aeruginosa* в 1 мл. Проведено оцінку придатності методик визначення мікробіологічної чистоти. Встановлено, що досліджуваний препарат за стандартних методів дослідження володіє антимікробною активністю по відношенню до тест-мікроорганізмів *B. subtilis* ATCC 6633 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить антибіотик), *C. albicans* ATCC 10231 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить антибіотик) і не володів антимікробною дією по відношенню до тест-мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 6538 (на соєво-казеїновому агарі) та *P. aeruginosa* ATCC 9027 (на соєво-казеїновому агарі). З метою нейтралізації антимікробної активності було запропоновано та доведено ефективність використання лецитину та полісорбату як речовин, що знімають антибактеріальний ефект, у поєднанні із розведенням досліджуваного зразка у 50 разів. Розроблена методика визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів для досліджуваного препарату відповідає критеріям придатності, що пред'являються ДФУ 2.0 (2.6.12) та може бути використана при контролі його мікробіологічної чистоти. Було теоретично обґрунтовано доцільність оцінки ризиків у технології отримання препарату на основі

рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини у формі назального спрею відповідно до ДСТУ ISO 14971 із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок. Було встановлено, що найбільш критичним етапом виробництва є ділянка приготування стерильного розчину, що включає приготування напівпродукту та стерилізуючу фільтрацію препарату. Проведена перспективна валідація найкритичніших етапів технології засвідчила її стабільність та відповідність встановленим критеріям прийнятності.

**Результати, отримані у даному розділі, опубліковані у таких працях:**

1. Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Карпенко О.Я., Дуган О.М. Обґрунтування параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2015. – Вип. 812. – С. 175–183.

2. Луценко Т.М., Андрюкова Л.М., Фетісова Н.Г., Марінцова Н.Г., Галкін О.Ю. Обґрунтування складу та технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2016. – Вип. 841. – С. 174–180.

3. Луценко Т.М., Старосила Д.Б., Рибалко С.Л., Галкін О.Ю. Методи оцінки біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та дослідження стабільності препарату на його основі // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2016. – №3. – С. 48–54.

4. Луценко Т.М., Горшунов Ю.В., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2017. – №3. – С. 56–63.

5. Galkin O.Yu., Lutsenko T.M., Gorshunov Yu.V., Motronenko V.V. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, 3. – P. 52–59.

6. Луценко Т.М. Біологічна стандартизація препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Тези X Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 53.

7. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Основні аспекти біологічної стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Тези VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2016. Молодіжний форум з нанобіотехнологій-2016» (25-26 травня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 81.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення і нові шляхи вирішення наукової задачі, що стосується розробки біотехнології створення різних форм препарату рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини (рІЛ-7) та його стандартизації. Результати досліджень дають змогу зробити наступні висновки.

1. Було обґрунтовано раціональні параметри біотехнології отримання та очистки рІЛ-7, що дозволяє одержувати останній із високою біологічною активністю *in vitro* (поживне середовище складу №1, 37,5 °С, 17 годин, індукція на основі *lacUV5* промотора). Показано, що рІЛ-7 накопичується у клітинах *E. coli* штаму BL21 (DE3) у вигляді тілець-включень; частка цільового білку становить 15-20% від всіх бактеріальних білків, а вихід складає 0,9 мг/мл біомаси. Розроблена схема очистки цільового продукту передбачає поєднання гель-фільтрації на сефедексі G-25 та іонообмінної хроматографії на сефарозах Q і SP.

2. Вперше було показано, що рІЛ-7 ефективно інгібує репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С (ВГС) в умовах *in vitro* (CC<sub>50</sub> – 3 мкг/мл, ED<sub>50</sub> – 4,7 нг/мл, IS – 640). Найвища проліферація інтактних Т-клітин визначається при дозах рІЛ-7 0,3 і 0,025 мкг/мл. рІЛ-7 по-різному впливав на інфіковані ВГС культури: в перші 3 доби кількість клітин зменшувалася або не змінювалася, а через 2-3 тижні – збільшувалася майже в 2 рази.

3. Проведено адаптацію методики визначення біологічної активності рІЛ-7 із використанням моноклеарних клітин периферичної крові людини. Результати здійсненої валідації даної методики за такими показниками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність довели можливість застосування даного методу для рутинного аналітичного контролю якості препаратів рІЛ-7.

4. Обґрунтовано профіль якості спрею назального на основі рІЛ-7, що відповідає вимогам керівних документів, розроблено склад препарату та технологію його виготовлення. Шляхом визначення зміни біологічної

активності рІЛ-7 *in vitro* протягом 1 року (протівірусна дія щодо ВГС, вірусу простого герпесу II типу та вірусу грипу; проліферація моноклеарних клітин периферичної крові людини) встановлено склад препарату, що забезпечує найкращі показники стабільності (рецептура на основі консерванту ніпагіну та стабілізатору поліетиленгліколю 400).

5. Обґрунтовано технологічну та апаратурну схеми виготовлення спрею назального на основі рІЛ-7.

6. Науково обґрунтовано параметри аналітичної стандартизації субстанції рІЛ-7 та препарату назального застосування на його основі, а також розроблено методи контролю їх якості. Встановлено, що розроблений препарат володіє антимікробною активністю по відношенню до тест-мікроорганізмів (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*). З метою нейтралізації антимікробної активності було запропоновано та доведено ефективність використання лецитину та полісорбату як речовин, що знімають антибактеріальний ефект, у поєднанні із розведенням досліджуваного зразка у 50 разів під час перевірки його мікробіологічної чистоти.

7. Обґрунтовано доцільність оцінки ризиків у технології отримання препарату на основі рІЛ-7 у формі назального спрею із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок. Встановлено, що найбільш критичним етапом виробництва є ділянка приготування стерильного розчину, що включає приготування напівпродукту та стерилізуючу фільтрацію препарату. Проведена перспективна валідація найкритичніших етапів технології засвідчила її стабільність та відповідність встановленим критеріям прийнятності.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Andersen D.C., Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2002. – Vol. 13. – P. 117-123.
2. Glick B.R., Pasternak J.J. *Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*. Second edition, Department of biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada. – ASM Press Washington, D.C., 2002.
3. Namen A.E., Schmierer A.E., Marc C.J. et al. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors // *J. Exp. Med.* – 1988. – Vol. 167 – P. 988-1002.
4. Goodwin R. G., Schmierer A. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells // *A. Proc. Natl. Acad. Sci. – USA*. – 1989. – Vol. 86 – P. 302-306.
5. Lundström W, Fewkes N, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Seminars in Immunology*. 2012;24(3):218-224. doi:10.1016/j.smim.2012.02.005.
6. Dawood A., Abdul Basit S., Jayaraj M., Gish R.G. Drugs in Development for Hepatitis B. *Drugs*. 2017;77(12):1263-1280. doi:10.1007/s40265-017-0769-2.
7. Shindo Y., Fuchs A.G., Davis C.G., et al. Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017;101(2):543-554.
8. Wong J., Christopher M.E., Viswanathan S., Schnell G., Dai X., Van Loon D., Stephen E.R. Aerosol and nasal delivery of vaccines and antiviral drugs against seasonal and pandemic influenza. *Expert Rev Respir Med*. 2010; 4(2): 171-7. doi: 10.1586/ers.10.15.
9. IL-7 Drug substance, composition, preparation and uses. pat. US7,585,947B2 / Michel Christian Morre, Brigitte Assouline; Pierre Cortez; Anne Gregoire; Date of Patent: Sep. 8, 2009.
10. Kolybo D.V. Immunobiology of diphtheria. Recent approaches for the prevention, diagnosis, and treatment of disease / D.V. Kolybo, A. A. Labyntsev, S. I.



Romaniuk, A. A. Kaberniuk, O. M. Oliinyk, N. V. Korotkevich, S. V. Komisarenko // Біотехнологія. - 2013. - Т. 6, № 4. - С. 43-62.

11. Pokholenko Ia.O. Development of the chromatographic medium for the affinity isolation of the recombinant hIFN- $\beta$ 1b based on immobilized single-chain antibodies / Ia. O. Pokholenko, O. B. Gorbatiuk, O. V. Okunev, D. M. Irodov, M. I. Degtiarova, O. G. Palivoda, V. A. Kordium // Biopolymers and cell. - 2015. - Vol. 31, № 4. - С. 279-284.

12. Sofer G. Chapter 7. Validation of Biotechnology Processes. In: Pharmaceutical Process Validation: Second Edition, Revised and Expanded / Editors: R.A. Nash, A.H. Wachter, 3rd ed. – New York: Marcel Dekker, 2003. – P. 252-274.

13. NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95)

14. Chantry D., Turner M., Feldmann M.. Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta // Eur. J. Immunol. – 1989. – P. 783-786.

15. Sutherland G.R., Baker E., Fernandez K. E. The gene for human interleukin-7 (IL-7) is at 8q12–13 // Hum. Genet. – 1989. – P. 371-372.

16. Craig Craig A., Julie A. D., Scott T.R. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7Ra Complex // Structure. – 2009. – Vol. 17 – P. 54–65.

17. Peschon J.J., Morrissey P.J., Grabstein K.H. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin-7 receptor-deficient mice // J. Exp. Med. – 1994. – P. 1955-1960.

18. N. K Vudattu Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants // Genes and Immunity. – 2009. – Vol. 10. – P. 132-140.

19. Puel A., Ziegler S.F., Buckley R.H., Leonard W.J. Defective IL-7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency // Nat. Genet. – 1998. – Vol. 20. – P. 394-397.

20. Bolotin E., Annett G., Parkman R., Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count // Bone Marrow Transplant. – 1999. – Vol. 23. – P. 783-788.

21. Fry, T. J., Connick E., Falloon J. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis // *Blood*. – 2001. – P. 2983-2990.
22. Kroemer R.T., Doughty S. W., Robinson A.J. , Richards W.G. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling. // *Protein Engineering*. – 1996.– Vol. 9, №. 6. – P. 493-498.
23. Lupton S.D., Gimpel S., Jerzy R. Characterization of the human and murine IL-7 genes // *J Immunol*. – 1990. – №. 144. P. 3592-3601.
24. Becker G. W., Hsiung H. M. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli* Purification and characterization // *Febs Letters*. – 1986. – Vol. 204, № 1. – P.145-150.
25. Sorensen H. P., Mortensen K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* // *J. of Biotechnology*. – 2005. – P. 113–128.
26. Sivashanmugam A. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli* // *Protein Science*. – 2009. – V. 18. – P. 936-948.
27. Chang C.Y., Cohen S.N. Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the P15A Cryptic Miniplasmid // *J. of Bacteriology*. – 1978. – P. 1141-1156
28. Kamionka M. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli* // *Cur. Pharm. Biotechnology*. – 2011 – V. 12. – P. 268-274.
29. Mirzaei M., Xu Y., Elias C. B., Prakash S. Nonviral Production of Human Interleukin-7 in *Spodoptera Frugiperda* Insect Cells as a Soluble Recombinant Protein // *J. of Biomed. and Biotechnology*. – 2009 – P. – 1-8.
30. Mirzaei M., Jardin B., Elias C. B., Prakash S. Expression and Production of Human Interleukin-7 in Insect Cells Using Baculovirus Expression Vector System (BEVS) // *Appl. Biochem. Biotechnol*. – 2008. – P. 93-103
31. Luo Y., Kong X., Xu A., Jin S., Wu D. Expression, purification, and functional characterization of recombinant human interleukin-7 // *Protein Expr. and Purif*. – 2009. – V. 63. – P. 1-4

32. Ouellette T., Destrau S., Ouellette T., Zhu J., Roach J.M., Coffman D., Hecht T., Lynch J.E., Giardina S.L., Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies // *Protein Expr. and Purif.* – 2003. – V. 30 – P. 156-166
33. Busso D., Stierlé M., Thierry J.C., Moras D. A comparison of inoculation methods to simplify recombinant protein expression screening in *Escherichia coli* // *BioTechniques.* – 2008 – P. 101-106.
34. Gopal G.J., Kumar A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli* // Springer Science+Business Media. – New York. – 2013.
35. Tesarova M., Optimization of growth condition *Escherichia coli* culture by method design of experiments to produce optimal amount of studied genetically insert protein.
36. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // *Protein Expr. Purif.* – 2005. – V. 41, № 1. – P. 207-234.
37. Makrides S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. // *Microbiol. Rev.* – 1996. – V. 60. – P. 512-538.
38. Sanchez de Groot N., Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies // *Febs Let.* – 2006. – P. 6471-6476.
39. Thapa A. Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to *Escherichia coli* thermostable proteins // *BioTechniques.* – 2008. – V. 44. – P. 787-796.
40. Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Широбоков, А.А. Григоренко, О.М. Дуган, Т.М. Луценко, А.Г. Комар; Під ред. В.П. Широбокова. К.: НТУУ «КПІ», 2015, 204 с.
41. Луценко Т.Н., Галкин А.Ю. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного // *Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химия, технология органических веществ и биотехнология».* – 2015. – 4, 177. – С. 188-197.

42. Гильчук П.В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме // Biopolymers and Cell. – 2004. – Т. 20, № 3. – С. 182-191.
43. Martineau P., Jones P., Winter G. Expression of an antibody fragment at high-levels in bacterial cytoplasm // J. Mol. Biol.—1998. — Vol. 280. — P. 117-127.
44. Eiberle M. K., Jungbauer A. Technical Refolding of Proteins, Do we have Freedom to Operate // Biotech. Journal. – 2010. – Vol. 5(6). — P. 547-559.
45. Bernardez C. Protein refolding for industrial processes // Curr. Opin. Biotech. – 2001. – V. 12. – P. 202-207
46. Cabrita L.D., Bottomley S.P. Protein expression and refolding – A practical guide to getting the most out of inclusion bodies // Biotechnol. Annu. Rev. – 2004. – V. 10. – P. 31-50.
47. Baynes M. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. / B. // Biochemistry. – 2005. – V. 44. – P. 4919-4925.
48. Geng X., Wang L. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs // J. Chromatogr. B. – 2008. – Vol. 866(1-2). – P. 133-153.
49. Raymond F., Rolland D., Gauthier M. et al. Purification of a recombinant protein expressed in yeast: optimization of analytical and preparative chromatography // J. Chromatogr. B. – 1998. – Vol. 706(1). – P. 113-121.
50. Gilar M., Olivova P., Daly A. E., Gebler J. C. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions // J. Sep. Sci. – 2005 – Vol. 28 (14). – P. 1694–1703.
51. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.3:2013 Лікарські засоби. Специфікації: методи випробувань та критерії прийнятності для біотехнологічних/біологічних продуктів (ICH Q6B). – К.: МОЗ України, 2013
52. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.2:2004. – Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності. – К.: МОЗ України, 2004.
53. Palani S., Gueorguieva L., Rinas U. et al. Recombinant protein purification using gradient-assisted simulated moving bed hydrophobic interaction

chromatography. Part I: selection of chromaographic system and astimation of adsoption isotherms // J. Chromatogr. A. – 2011. – Vol. 1218(37). – P. 6396-6401.

54. Steen J., Ramstrom M., Uhlen M. et al. Automated sample preparation method for mass spectrometry analysis on recombinant proteins // J. Chromatogr. A. – 2009. – Vol. 1216(20). – P. 4457-4464.

55. Lopez-Soto-Yarritu P., Diez-Masa J.C. Cifuentes A. et al. Improved capillary isoelectric focusing method for recombinant erythropoietin analysis // J. Chromatogr. A. – 2002. – Vol. 958(1-2). – P. 221-228.

56. Tran N.T., Taverna M., Chevalier M. et al. One-step capillary isoelectric focusing for the separation of the recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein glycoforms // J. Chromatogr. A. – 2000. – Vol. 866(1). – P. 121-135.

57. Campos F., Guillen G., Reyes J.L. et al. A general method of protein purification for recombinant unstructured non-acidic proteins // Protein Expr. Purif. – 2011. – Vol. 80(1). – P. 47-51.

58. Zhu D., Qian F., Wu Y. et al. Determination of protein concentration for protein-protein conjugates using ultraviolet absorption // J. Immunol. Methods. – 2013. – Vol. 387(1-2). – P. 317-321.

59. Kazaks A. Dishlers A., Pumpens P. et al. Mosaic particles formed by wild-type hepatitis B virus core protein and its deletion variants consist of both homo- and heterodimers // FEBS Lett. – 2003. – Vol. 549 (1-3). – P. 157-162.

60. Subramaniam S., Frey J., Huang B. et al. Immunoblot assays using recombinant antigens for the detection of Mycoplasma hyopneumoniae antibodies // Vet. Microbiol. – 2000. – Vol. 75(1). – P. 99-106.

61. Raymond F., Rolland D., Gauthier M. et al. Purification of a recombinant protein expressed in yeast: optimization of analytical and preparative chromatography // J. Chromatogr. B. – 1998. – Vol. 706(1). – P. 113-121.

62. Frey S., Gorlich D., Purification of protein complexes of defined subunit stoichiometry using a set of orthogonal, tag-cleaving proteases // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1337 – P. 106-115.

63. Li Y., Rao C., Tao L. et al. Improved detection of variants in recombinant human interferon alpha-2a products by revers-phase high-performance liquid chromatography on a core-shell stationary phase // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 2014. – Vol. 88. – P. 123-129.

64. Damhof R.A. Feijlbrief M., Welling-Wester S. et al. Purification of the integral membrane glycoproteins D of herpes simplex virus types 1 and 2, produced in the recombinant baculovirus expression system, by ion-exchange high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – Vol. 676 (1) – P. 43-49.

65. Clore G.M., Gronenborn A.M., Comparasion of the solution nuclear magnetic resonance and X-ray crystal structures of human recombinant interleukin-1 beta // *J. Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 221(1). – P. 47-53.

66. Szyperski T., Güntert P., Stone S.R. et al. Nuclear magnetic resonance solution structure of hirudin(1-51) and comparison with corresponding three-dimensional structures determined using the complete 65-residue hirudin polypeptide chain // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 228(4). – P. 1193-1205.

67. Mire-Sluis A.R., Page L., Thorpe R. Quantitative cell line based bioassays for human cytokines // *J. of Immunol. Methods.* – 1995. – Vol. 187. – P.191-199.

68. Yokota T., Osuka T., Mosman T., at al. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 5894-5898,

69. A.A. van de Loosdrecht, R.H.J. Beelen, G.J. Ossenkoppele, M.G. Broekhoven, M.M.A.C. Langenhuijsen A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia // *Journal of Immunological Methods.* – 1994. – Vol. 174. – P. 311-320

70. Mire-Sluis A.R., Thorpe R. Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassays using cytokine responsive cell lines // *J. of Immunol. Methods.* – 1998. – Vol. 211. – P.199-210.

71. ICH Topic Q5A (R1) Quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin (CPMP/ICH/295/95). – London, European Medicines Agency: 1997. – 29p.
72. O’Keefe D.O. Analysis of protein impurities in pharmaceuticals derived from recombinant DNA // *Separation Sci. Technol.* – 2000. – Vol.2. – P.23-70.
73. Wendler J., Hoffmann A., Gross G. et al. Development of an enzyme-linked immunoreceptor assay (ELIRA) for quantification of the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 // *J. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 119(4). – P. 425-435.
74. Spencer K.A., Osorio F.A., Hiscox J.A. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25(30). – P. 5653-5659.
75. Imsoonthornruksa S., Noisa P., Parnpai R. et al. A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli* // *J. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 151(4). – P. 295-302.
76. Hua L., Liu Y., Zhen S. et al. Expression and biochemical characterization of recombinant human epididymis protein 4 // *Protein Expr. Purif.* – 2014. – Vol. 102. – P. 52-62.
77. Priya R., Khan M., Rao M.K. et al. Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein based IgM ELISA for chikungunya virus // *J. Virol. Methods.* – 2014. – Vol. 203. – P. 15-22.
78. Noble J. E., Bailey M. J. Quantitation of Protein // *Methods in Enzymology.* – 2009. – Vol. 463. – P. 74-95.
79. Порва Ю.І., Рибалко С.Л., Дядюн С.Т. та ін. Дослідження протівірусної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С // *Наукові вісті НТУУ «КПІ».* – 2015. – 3. – С. 52–60.

80. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Под ред. Д.К. Львова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2013. – С. 1200 с.

81. Блюмкин В.Н., Жданов В.М. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. – М.: Медицина, 1973. – 128 с.

82. Державна фармакопея України. Перше видання. Доповнення 2 // Під ред. О.І. Гризодуба. Х.: РІРЕГ, 2008, 617 с.

83. РМГ 61–2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки [Текст]. Взамен РМГ 61–2003; дата введения 2012–09–01. М.: Стандартинформ, 2012, 60 с.

84. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков / В.Ю. Урбах. М.: Издательство АН СССР, 1963, 321, [1] с.

85. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. М.: Издательство «Спорт и Культура - 2000», 2007, 192 с.

86. Гончарук С.А. Мембранные белки семейства KCNE: создание эффективных бактериальных штаммов-продуцентов, очистка и изучение структурных особенностей / Автореферат дис. ...канд. наук: 03.00.02 – Биофизика. – М., 2008. – 24 с.

87. Мукантаев К.Н. Диагностические свойства синтезированного *Escherichia coli* рекомбинантного антигена gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота / К.Н. Мукантаев, А.В. Шустов, Ы. Сыдыкнаби и др. // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – №2. – С. 1-10.

88. Славченко И.Ю. Особенности экспрессии целевого гена в составе вектора на основе бактериофага лямбда и изучение путей ее оптимизации / И.Ю. Славченко, В.А. Шмидт, С.И. Черных С.И. и др. // Біополімери і клітина. – 2003. – Т. 19, № 1. – С. 81-88.

89. Siegel J.P., Mostovski H.S. A bioassay for the measurement of human interleukin-4. // J. Immunol. Methods. – 1990. – Vol. 142. – P.257-263



90. Ishihara K., Medina K., Hayashi S. et al. Stromal-Cell and Cytokine-Dependent Lymphocyte Clones Which Span the Pre-B- to B-Cell Transition // *Developmental Immunology*. – 1991. – Vol. 1. – P.149-161

91. Sudo T., Ito M., Ogawa Y. et al. Interleukin-7 production and function in stromal cell-dependent B cell development // *J. Exp. Med.* – 1989. – Vol. 170. – P. 333-338.

92. Park L.S., Friend D.J., Schmierer A.E. et al. Murine interleukin-7 (IL-7) receptor characterization on an IL-7-dependent cell line // *J. Exp. Med.* – 1990. – Vol.171. – P.1073-1089

93. Cosenza L., Sweeney E., Murphy J.R. Disulfide bond assignment in human Interleukin-7 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy and site-directed cysteine to serine mutational analysis // *J. of Biol. Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. - №. 52. – P. 32995–33000.

94. Khaled A.R., Kim K., Hofmeister R., et al. Durum Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH // *PNAS*. – 1999. – Vol. 96. – No. 25. – P. 14476-14481.

95. Villalba S., Salvucci O., Aoki Y. et al. Serum inactivation contributes to the failure of stromal-derived factor-1 to block HIV-I infection in vivo // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2003. – Vol. 74. – P. 880-888.

96. Луценко Т.М., Андрюкова Л.М., Фетісова О.Г. та ін. Обґрунтування складу та технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // *Вісник НУ “Львівська політехніка”*. Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. — 2016. — 841. — С. 174—180.

97. Smith D.K., Neal J.J., Holmberg S.D. et al. Unexplained opportunistic infections and CD4 T-lymphocytopenia without HIV infection: an investigation of cases in the United States: the Centers for Disease Control Idiopathic CD4 T lymphocytopenia // *Task Force. N Engl J Med*. – 1993. – Vol.328. – P. 373-379.

98. Teixeira L., Valdez H., McCune J.M., et al. Poor CD4 T-cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function // *AIDS*. – 2001. – Vol. 15. – P.1749-1756

99. Bradley L. M., Haynes L., Swain S.L. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis // Trends Immunol. – 2005. – Vol. 26. – P. 172-176.
100. Sharma S., Batra R.K., Yang S.C. et al. Interleukin-7 gene-modified dendritic cells reduce pulmonary tumor burden in spontaneous murine bronchoalveolar cell carcinoma // Hum. Gene Ther. – 2003. – Vol.14.
101. Huang M., Sharma S., Zhu L.X. et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF production and signaling in pulmonary fibrosis // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol. 109. – P.931-937.
102. Mackall C.L., Fry T.J., Gress R.E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol.11. – P. 330-342.
103. Sportès C., Hakim F.T., Memon S.A. et al. Administration of rhIL-7 in humans increases *in vivo* TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets // J. Exp. Med. – 2008. – Vol. 205. – P.1701-1714.
104. Moller P., Bohm M., Czarnelzki B.M., Schadendoif D. Interleukin-7: Biology and implications for dermatology // Exp. Dermalol. – 1996. – Vol. 5. P.129-137.
105. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y. et al. Interleukin-1 Family Cytokines as Mucosal Vaccine Adjuvants for Induction of Protective Immunity against Influenza Virus // J. Virologi. – 2010. – Vol. 84. – No. 24. – P. 12703-12712.
106. Sportes C., Gress R.E., Mackall C.L. Perspective on Potential Clinical Applications of Recombinant Human Interleukin-7 // Cytokine Therapies: Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2009. – Vol.1182. – P.28–38.
107. Галкін О.Ю. Біоаналітична валідація імуноферментного аналізу для якісного (напівкількісного) визначення антитіл класу IgA до Chlamydia trachomatis / О.Ю. Галкін, Ю.В. Горшунов, О.Б. Бесараб // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія «Біологія, хімія». 2014; Т. 27 (66), № 3: 14-25.
108. Lutsenko T.N., Kovalenko M.V., Galkin O.Yu. Validation of biological activity testing procedure of recombinant human interleukin-7 // Ukr Biochem J. – 2017. – Vol.89(1). – P. 82-89.

109. Gunar O.V., Builova I.A. Microbiological Quality Control of Biotechnological Pharmaceuticals // *Pharmac Chem J.* – 2016. – Vol.50(2). – P.108-113. (In Ukrainian).
110. Gunar O.V., Kalamova N.I., Evtushenko N.S. Determination of antimicrobial action of drugs - practical approaches // *Farmaciya.* – 2002. – Vol.(2): 4-7. (In Russian).
111. Zhemerova EG, Dunay EV, Galkin AYU, Mulder L, van Hemert S. Development of quality control methods and research of probiotic preparation for the treatment and prevention of allergy and dysbiosis. *Ukr J Clin Lab Med.* 2012; 7(4): 169-174.
112. Системи управління якістю. Вимоги: ДСТУ ISO 9001:2015 (ISO 9001:2015, IDT). — Чинний від 01—07—2016. — К.: ДП “УкрНДНЦ”, 2016. — 33 с.
113. Сучасний стан та тенденції розвитку нормативно-правового регулювання у сфері забезпечення якості лікарських засобів / Н.О. Ветютнева, С.Г. Убогов, Л.Б. Пилипчук та ін. // *Фармацевт. ж.* — 2014. — 3. — С. 66—74.
114. Деренська Я.М. Управління якістю проекту в умовах фармацевтичного підприємства // *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації.* — 2011. — 3. — С. 10—16.
115. Лікарські засоби. Належна виробнича практика: Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 [затверджена наказом Міністерства охорони здоров'я України від 29.07.2016 р. No 798]. — К.: МОЗ України, 2016. — 358 с.
116. Вироби медичні. Настанови щодо управління ризиком: ДСТУ ISO 14971:2009. — Введено вперше; чинний від 01—01—2012. — К.: Держспоживстандарт України, 2009. — 68 с.
117. Вироби медичні. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання: ДСТУ ISO 13485:2005. — Введено вперше; чинний від 01—10—2006. — К.: Держспоживстандарт України, 2007. — 56 с.

## **ДОДАТОК А. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ ТА АПРОБАЦІЇ**

**"ЗАТВЕРДЖУЮ"**

**Заступник директора**

**ДП "Український медичний  
центр сертифікації"**



**Г.А. Мартиненко**  
2017 р.

## **АКТ**

### **впровадження науково-методичної розробки**

Об'єкт впровадження: науково-методичні рекомендації щодо аналізу ризиків технології виготовлення медичних виробів у формі назальних спреїв на основі рекомбінантних білків.

Джерело науково-технічної інформації:

- Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Широбоков, А.А. Григоренко, О.М. Дуган, Т.М. Луценко, А.Г. Комар; Під ред. В.П. Широбокова. – К.: НТУУ "КПІ", 2015. – 204 с.
- Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Карпенко О.Я., Дуган О.М. Обґрунтування параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Серія "Хімія, технологія речовин та їх застосування". – 2015. – Вип. 812. – С. 175-183.
- Луценко Т.М., Горшунов Ю.В., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2017. – №3. – С. 56-63.

Підрозділ, відповідальний за впровадження: відділ технічного контролю та аналізу.

Результати апробації та впровадження: науково-методичні рекомендації, що сформовані у наукових виданнях, частково використовуються при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентується постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 "Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів".

Відповідальний за впровадження:

Начальник відділу оцінки  
відповідності, сертифікації продукції  
та систем управління якістю  
ДП "УМЦС"

*А.Г. Комар*

**А.Г. Комар**



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА»

Л.В. Чеснова

2017 р.

## АКТ

### апробації науково-методичної розробки

Об'єкт апробації та впровадження: науково-методичні підходи до отримання рекомбінантних білків, стандартизації їх якості та технології виготовлення.

Джерело науково-технічної інформації – наукові публікації:

- Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Широбоков, А.А. Григоренко, О.М. Дуган, Т.М. Луценко, А.Г. Комар; Під ред. В.П. Широбокова. – К.: НТУУ «КПІ», 2015. – 204 с.
- Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Карпенко О.Я., Дуган О.М. Обґрунтування параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2015. – Вип. 812. – С. 175-183.
- Луценко Т.Н., Галкин А.Ю. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химия, технология органических веществ и биотехнология». – 2015. – № 4 (177). – С. 188-197. (Білорусь).
- Луценко Т.М., Андрюкова Л.М., Фетісова О.Г., Марінцова Н.Г., Галкін О.Ю. Обґрунтування складу та технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2016. – Вип. 841. – С. 174-180.
- Луценко Т.М., Горшунов Ю.В., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2017. – №3. – С. 56-63.
- ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний. Технічні умови».

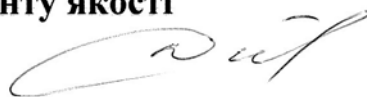
Підрозділ, відповідальний за апробацію та впровадження: відділ регуляторних відносин, менеджменту якості і науково-технічних розробок.

Період, протягом якого проводилася апробація та впровадження: 01.2016 р.  
– 06.2017 р.

Результати апробації та впровадження: досягнуто оптимізацію процедур отримання рекомбінантних білків, стандартизації їх якості та технології виготовлення; проведено перспективну валідацію технології отримання назального спрею на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок, яка підтвердила стабільність процесу та його відповідність критеріям прийнятності.

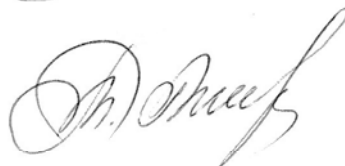
*Відповідальні за апробацію та впровадження:*

**Заступник начальника відділу  
регуляторних відносин, менеджменту якості  
і науково-технічних розробок**



**І.Я. Добрянська**

**Спеціаліст із реєстрації,  
сертифікації та якості**



**Т.М. Луценко**

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Декан факультету біотехнології і  
біотехніки Національного  
технічного університету України  
«Київський політехнічний  
інститут імені Ігоря Сікорського»



О.М. Дуган  
«23» 10 2017 р.

### АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

**Об'єкт впровадження:** науково-методичні та науково-технічні основи розробки препаратів на основі рекомбінантних білків та їх стандартизації.

**Автор розробки:** Луценко Т.М., аспірант кафедри промислової біотехнології КПІ імені Ігоря Сікорського.

#### Джерела інформації:

- Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Широбоков, А.А. Григоренко, О.М. Дуган, Т.М. Луценко, А.Г. Комар; Під ред. В.П. Широбокова. – К.: НТУУ «КПІ», 2015. – 204 с.
- Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Карпенко О.Я., Дуган О.М. Обґрунтування параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2015. – Вип. 812. – С. 175-183.
- Луценко Т.Н., Галкин А.Ю. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химия, технология органических веществ и биотехнология». – 2015. – № 4 (177). – С. 188-197. (Білорусь).
- Луценко Т.М., Андрюкова Л.М., Фетісова О.Г., Марінцова Н.Г., Галкін О.Ю. Обґрунтування складу та технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2016. – Вип. 841. – С. 174-180.
- Луценко Т.М., Горшунов Ю.В., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2017. – №3. – С. 56-63.



**Результати впровадження:** науково-методичні та науково-технічні основи розробки препаратів на основі рекомбінантних білків та їх стандартизації впроваджено у навчальний процес студентів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія спеціалізації «Промислова біотехнологія» в рамках лекційних та практичних занять із дисциплін «Медична біотехнологія» та «Розробка біофармацевтичної продукції та організація виробництва». Впровадження вищезазначених розробок дозволило удосконалити викладання наступних розділів (тем): «Розробка рекомбінантних білків медичного призначення», «Розробка, випробування та організація виробництва медичних виробів біотехнологічного походження».

**Відповідальні за впровадження:**

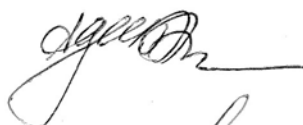
*Завідувач кафедри*

*промислової біотехнології, д.т.н., доц.*




*Т.С. Тодосійчук*

*Професор кафедри промислової  
біотехнології, д.б.н., доц.*



*О.Ю. Галкін*

*Аспірант кафедри промислової  
біотехнології*



*Т.М. Луценко*

**ДОДАТОК Б. НОРМАТИВНИЙ ДОКУМЕНТ НА ПРЕПАРАТ**  
*(копії титульного аркуша технічних умов та*  
*висновку державної санітарно-епідеміологічної експертизи )*

ДКПП 20.42.19-90.00

УКНД 71.100.35

ПОГОДЖЕНО

Висновок державної санітарно-  
епідеміологічної експертизи

від « 19 » 05 2017 р.

№ 602-123-д0-2/15716



ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ТОВ «УНІВЕРСАЛЬНЕ  
АГЕНТСТВО «ПРО-ФАРМА»

Л.В. ЧЕСНОВА

« 19 » 05 2017 р.

## ЗАСІБ ПРОФІЛАКТИЧНО-ГІГІЄНІЧНИЙ

### ТЕХНІЧНІ УМОВИ

ТУ У 20.4-34414427-013:2017

Уведено вперше

Дата надання чинності: « 19 » 05 2017 р.  
Чинні до: « 19 » 05 2027 р.

РОЗРОБЛЕНО

Спеціаліст із реєстрації, сертифікації та  
якості ТОВ «УНІВЕРСАЛЬНЕ  
АГЕНТСТВО «ПРО-ФАРМА»

*Т.М. Луценко*  
Т.М. ЛУЦЕНКО  
« 03 » 04 2017 р.

Копія вірна:

Директор ТОВ «УНІВЕРСАЛЬНЕ АГЕНТСТВО «ПРО-ФАРМА»

Л.В. Чеснова





**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ  
БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**  
вул. Б. Грінченка, 1, м. Київ, 01001, тел. 279-12-70, 279-75-58, факс 279-48-83,  
e-mail: info@consumer.gov.ua

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Голова Держпродспоживслужби  
Лапа В.І.



**ВИСНОВОК**  
**державної санітарно-епідеміологічної експертизи**

від 19.05 2017 р.

№ 602-123-20-21 15716

Об'єкт експертизи: Технічні умови ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний. Технічні умови»

Код за ДКПП, УКТЗЕД, артикул: 20.42.19-90.00

Сфера застосування та реалізації об'єкта експертизи: нормативний документ для виготовлення профілактично-гігієнічного засобу

Розробник: ТОВ «УНІВЕРСАЛЬНЕ АГЕНТСТВО «ПРО-ФАРМА», Україна, 03170, м. Київ, вул. Перемоги, 9, оф. 20; тел./факс: (044) 422-50-70; код за ЄДРПОУ: 34414427  
(адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, веб-сайт)

Заявник експертизи: ТОВ «УНІВЕРСАЛЬНЕ АГЕНТСТВО «ПРО-ФАРМА», Україна, 03170, м. Київ, вул. Перемоги, 9, оф. 20; тел./факс: (044) 422-50-70; код за ЄДРПОУ: 34414427  
(адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, веб-сайт)

За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи технічні умови ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний. Технічні умови» відповідають вимогам безпеки для здоров'я і життя людини і можуть бути погоджені.

Висновок дійсний: на термін дії технічних умов ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний. Технічні умови»

Відповідальність за дотримання вимог цього висновку несе заявник.

Комісія з державної  
санітарно-епідеміологічної  
експертизи  
Державної установи «Інститут  
медицини праці НАМН України»

01033, м. Київ, вул. Саксаганського, 75,  
тел.: приймальня: (044) 284-34-27,  
e-mail: yik@panu.kiev.ua;  
секретар експертної комісії  
(044) 289-63-94, e-mail: test-lab@ukr.net  
(найменування, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, веб-сайт)

Протокол експертизи № 7819 від 27 квітня 2017 р.

(№ протоколу, дата його затвердження)

Заступник Голови експертної комісії,  
заступник директора з наукової роботи  
ДУ "Інститут медицини праці НАМН України"

М.П.

Копія вірна:

Директор ТОВ «УНІВЕРСАЛЬНЕ АГЕНТСТВО «ПРО-ФАРМА»

Л.В. Чеснова

